



# **Cristallisation du transporteur ABC BmrA de *Bacillus subtilis*: développement d'une nouvelle méthode de dosage des détergents par Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)**

Arnaud Kilburg

## **► To cite this version:**

Arnaud Kilburg. Cristallisation du transporteur ABC BmrA de *Bacillus subtilis*: développement d'une nouvelle méthode de dosage des détergents par Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI). Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT: 2015LYO10116. tel-01285473

**HAL Id: tel-01285473**

**<https://theses.hal.science/tel-01285473>**

Submitted on 9 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 116 - 2015

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE DES SCIENCES ET SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité Biochimie

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 15 Septembre 2015

par

**Arnaud KILBURG**

**Cristallisation du transporteur ABC BmrA de *Bacillus subtilis*.  
Développement d'une nouvelle méthode de dosage des détergents  
par *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI).**

Directeur de thèse : Docteur Pierre FALSON

JURY	M. le Professeur Patrice GOUET	Président du jury
	Mme la Docteur Isabelle MUS-VETEAU	Rapporteur
	M. le Professeur James STURGIS	Rapporteur
	M. le Docteur Jean-Jacques LACAPÈRE	Rapporteur
	Mme la Docteur Nushin AGHAJARI	Examineur
	M. le Docteur Martin PICARD	Examineur
	M. le Docteur Pierre FALSON	Directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie

M. le Professeur Philippe LALLE

Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

## *COMPOSANTES SANTE*

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

Biologie Humaine

## *COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE*

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

## REMERCIEMENTS

---

Mes premières pensées s'adressent à mon directeur de thèse, Monsieur le docteur Pierre FALSON. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée depuis l'année de Master 2. Merci de m'avoir fait partager votre savoir scientifique et votre longue expérience dans le domaine des protéines membranaires. Je n'oublierai jamais votre enthousiasme pour la recherche et votre motivation débordante. Je vous suis également très reconnaissant de m'avoir soutenu dans mon projet de reprendre des études médicales et d'avoir fait en sorte que je puisse soutenir cette thèse en trois ans.

Je remercie également le docteur Atillio DI PIETRO, co-directeur de l'équipe « Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Médicaments » de m'avoir accueilli au sein de son équipe ainsi que les conseils qu'il m'a apportés lors des réunions et des nombreuses conversations à table.

J'adresse mes sincères remerciements aux trois rapporteurs de cette thèse, au Dr. Isabelle MUS-VETEAU, au Dr. James STURGIS et au Dr. Jean-Jacques LACAPERE ainsi qu'aux différents examinateurs : Pr. Patrice Gouet, Dr. Nushin AGHAJARI et Dr. Martin Picard pour avoir accepté de juger mes travaux de recherche.

Je veux exprimer ma reconnaissance à la Région Rhône-Alpes pour m'avoir fait confiance et m'avoir attribué une bourse de recherche doctorale.

Merci aux Drs. Nushin AGHAJARI et Martin Picard d'avoir participé à mes deux comités de suivi de thèse. Vos conseils m'auront été très précieux.

Ce travail est aussi le résultat de collaborations. Merci au docteur Jean-michel Jault pour ses conseils, sa gentillesse et de nous avoir accueillis dans son laboratoire pendant la période des travaux.

Je remercie le docteur Vincent CHAPTAL de m'avoir fait partager son savoir dans le domaine de la cristallographie des protéines membranaires, pour les nombreuses discussions scientifiques (mais aussi footballistiques) que nous avons eues.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire et de l'IBCP qui ont apporté de la joie et de la bonne humeur dans mon quotidien de doctorant. Je pense tout particulièrement à Lorena, Charlotte, Laurianne, Mylène, Doriane, Hélène, Rachad, Sandrine, Lucia, Elisabeta, Khadija, Josiane, Aicha, Aude, Frédéric, Virginie, Arthur et Cyril.

Enfin, j'adresse un énorme merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix. A la plus belle et meilleure des femmes, Julie, je te remercie de ton amour et de ton soutien sans faille ; sans toi ma vie ne serait pas ce qu'elle est.

# TABLE DES MATIERES

---

<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE 1 : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>22</b>
<b>I. Le phénotype de résistance aux médicaments</b>	<b>23</b>
<b>A. Cancer et résistance à la chimiothérapie</b>	<b>23</b>
Cancer et traitements	23
Les mécanismes de résistance à la chimiothérapie	24
a) Influence de l'environnement tumoral	24
b) Inactivation des médicaments	25
c) Réparation de l'ADN	25
d) Résistance à l'apoptose	26
e) Mutation de la cible cellulaire	26
f) Concentration du médicament insuffisante pour inhiber sa cible	27
(1) Réduction de l'afflux des drogues	27
(2) Efflux actif de l'agent anticancéreux	27
g) Compartimentation dans les organites	29
<b>B. La résistance des bactéries aux antibiotiques</b>	<b>30</b>
Définition et découverte	30
Le mode d'action des antibiotiques	31
a) Action sur la paroi par inhibition de la synthèse du peptidoglycane	32
b) Action sur la membrane cytoplasmique	33
c) Inhibition de la synthèse protéique	33
d) Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	33
e) Inhibition du métabolisme des folates	33
Les mécanismes de résistance chez la bactérie	34
a) Les mécanismes génétiques	34
b) Les mécanismes biochimiques	34
(1) Imperméabilisation de la membrane bactérienne	35
(2) Efflux actif de l'antibiotique	35
(3) Modification de la cible de l'antibiotique	35
(4) Inactivation de l'antibiotique	35
Les systèmes d'efflux bactériens	35
a) Les transporteurs MFS	37

b) La famille SMR	37
c) La famille RND	37
d) La famille MATE	38
e) Les transporteurs ABC	38
<b>II. Les transporteurs ABC</b>	<b>41</b>
<i>A. Généralités</i>	<b>41</b>
<i>B. Une topologie commune</i>	<b>41</b>
<i>C. Classification</i>	<b>42</b>
<i>D. Implication dans les pathologies humaines</i>	<b>45</b>
<i>E. Données cristallographiques sur les transporteurs ABC</i>	<b>46</b>
Les domaines de fixation des nucléotides (NBDs)	<b>46</b>
a) La structure commune des domaines NBDs	46
b) Les structures cristallographiques de domaines NBDs	50
c) Les interactions entre les domaines NBDs	54
d) Le mécanisme d'hydrolyse de l'ATP	57
e) Le cycle catalytique d'hydrolyse de l'ATP	58
f) Les NBDs asymétriques	59
Les domaines transmembranaires (TMDs)	<b>62</b>
a) La conformation des domaines transmembranaires	62
b) L'accès des substrats aux transporteurs ABC	63
c) La translocation des substrats	64
Les structures cristallographiques de transporteurs ABC entiers	<b>66</b>
a) Les importateurs ABC	66
(1) Les importateurs de type II	68
(a) L'importateur de vitamine B12, BtuCD	68
(b) L'importateur HI1470/71	74
(c) HmuUV	75
(d) Le mécanisme de transport	77
(2) Les importateurs de type I	79
(a) L'importateur de maltose, MalFGK <sub>2</sub>	79
(b) L'importateur de molybdate et de tungstate, ModB <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	82
(c) L'importateur de méthionine, MetNI	83
(d) L'importateur de résidus chargés positivement, Art(QN) <sub>2</sub>	84
(e) Le mécanisme de transport	85
b) Les exportateurs ABC	87

(1) Sav1866 de <i>Staphylococcus aureus</i>	88
(2) MsbA	89
(a) La polémique	89
(b) Les structures corrigées	90
(3) La glycoprotéine-P	91
(a) La P-gp de <i>Mus musculus</i> (2009)	91
(b) La P-gp de <i>C. elegans</i> (2012)	92
(c) Révision des structures de 2009	94
(d) Nouvelles structures de P-gp (2013)	96
(4) L'exportateur hétérodimérique TM287/288	99
(5) ABCB10, un exportateur ABC mitochondrial	103
(6) Atm1, un transporteur ABC de levure	105
(7) McjD, un transporteur de peptides antibactériens	109
(8) CmABCB1	111
(9) Question ouverte sur les structures d'exportateurs ABC	112
(10) Le mécanisme de transport	115
<b>III. Cristalliser une protéine membranaire : un défi</b>	<b>118</b>
<b>A. La surexpression</b>	<b>119</b>
<b>B. Les détergents</b>	<b>119</b>
Généralités	120
La cristallisation des protéines membranaires	124
La quantification du détergent	124
Les alternatives à la cristallisation en détergent	128
<b>IV. Le transporteur ABC BmrA de <i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>130</b>
<b>A. Généralités</b>	<b>130</b>
<b>B. Caractéristiques biochimiques et structurales</b>	<b>131</b>
Activités ATPasiques et état d'oligomérisation	131
Modèles 3D de BmrA par microscopie électronique	131
Les changements conformationnels	132
<b>C. Les objectifs de la thèse</b>	<b>134</b>
<b>CHAPITRE 2 : Etude structurale du transporteur ABC BmrA de <i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>135</b>
<b>I. Influence des détergents sur la purification et la cristallisation de BmrA</b>	<b>136</b>
<b>A. Matériel et méthodes</b>	<b>136</b>

Préparation des membranes enrichies en BmrA	134
a) Le matériel biologique	136
(1) La souche bactérienne	136
(2) Le plasmide d'expression	136
b) Minipréparation des plasmides	137
c) Préparation et transformation des bactéries compétentes C41(DE3)	137
d) Sur-production de BmrA	138
e) Lyse cellulaire et récupération des membranes enrichies en BmrA	138
f) Dosage des protéines membranaires par l'acide bicinchoninique	138
Purification de la protéine BmrA en FC12	139
a) Extraction de BmrA	139
b) Purification des protéines par chromatographie échangeuse d'anions	139
c) Purification par chromatographie d'affinité sur gel de nickel agarose	140
d) Dialyse et concentration des protéines	140
e) Dosage des protéines à 280 nm	140
Purification de BmrA en DDM, UDM, LMNG, DMNG et LDAO	141
a) Chromatographie d'affinité Ni-NTA	141
b) Chromatographie d'exclusion diffusion	141
c) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes	141
d) Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	142
Cristallogénèse et cristallographie de BmrA en FC12	142
a) La technique de la goutte suspendue en phase vapeur	142
b) Optimisation des conditions de cristallisation	143
c) Collecte des données de diffraction	143
<b>B. Résultats</b>	144
Etude des contaminants présents dans la purification de BmrA et les solutions pour les éliminer	144
<b>Publication 1 : "Stubborn contaminants : Influence of detergents on the purity of the multidrug ABC transporter BmrA"</b>	144
a) Résumé des principaux résultats	144
(1) La foscholine 12, le détergent le plus efficace pour solubiliser BmrA	144
(2) La purification et la cristallisation de BmrA en FC12 conduisent à la cristallisation de la porine OmpF de la membrane externe d' <i>E. coli</i>	145
(3) OmpF et AcrB, des contaminants cachés et nuisibles à la cristallisation des protéines membranaires	145
(4) Les solutions pour éliminer OmpF et AcrB	146

b) Discussion	175
Cristallisation d'OmpF dans deux formes cristallines différentes	176
<b>Publication 2 : "Two different centered monoclinic crystals of the <i>E. coli</i> outer-membrane protein OmpF originate from the same building block"</b>	<b>176</b>
a) Résumé des principaux résultats	176
(1) Deux structures cristallographiques d'OmpF, avec et sans tNCS	176
(2) Les conditions de cristallisation et le détergent influencent l'empilement cristallin d'OmpF	176
<b>C. Conclusion</b>	<b>193</b>
<b>II. Purification et cristallisation de BmrA sauvage et d'une forme mutée inactive en DDM et LMNG</b>	<b>194</b>
<b>A. Matériel et méthodes</b>	<b>194</b>
Produits chimiques	194
Le matériel biologique	194
Surproduction de BmrA	195
Solubilisation des protéines membranaires	195
Purification de BmrA en DDM et LMNG	195
a) Chromatographie d'affinité sur gel de nickel agarose	195
b) Chromatographie d'exclusion diffusion	196
La spectrométrie de masse type MALDI-Tof	196
Gel SDS-PAGE Tris-Tricine	197
Cristallogénèse de la protéine BmrA	198
<b>B. Résultats</b>	<b>202</b>
Expression de BmrA dans C43 (DE3) $\Delta$ AcrB d' <i>E. coli</i>	202
Purification et cristallisation de BmrA sauvage en $\beta$ -DDM	204
Purification et cristallisation de BmrA E504A en $\beta$ -DDM	209
Purification et cristallisation de BmrA E504A en LMNG	216
Homogénéité des échantillons purifiés en $\beta$ -DDM, LMNG et FC12	219
<b>C. Discussion</b>	<b>224</b>
<b>III. Essais de cristallisation sur BmrA E504A purifié dans des micelles mixtes de <math>\beta</math>-DDM-sodium cholate</b>	<b>227</b>
<b>A. Matériel et méthodes</b>	<b>227</b>
Sur-expression et préparation des membranes de BmrA E504A	227
Purification de BmrA E504A en DDM-sodium cholate	227
Cristallogénèse	228

Optimisation des conditions de cristallisation	229
La technique d'ensemencement	230
Optimisation des conditions de purification	230
<b>B. Résultats</b>	231
Purification et cristallisation de BmrA E504A en $\beta$ -DDM-sodium cholate	231
S'agit-il de cristaux correspondant à BmrA ?	240
Optimisation des conditions de cristallisation	242
a) Influence du sel	242
b) La technique d'ensemencement	243
c) Influence du précipitant	244
d) Influence de [KCl], de [BmrA], du pH et du ratio protéine/précipitant	248
e) Cristallisation en présence d'additifs	253
f) Co-cristallisation en présence de substrats	256
Optimisation des conditions de purification pour la cristallisation de BmrA	258
a) Influence du KCl	258
b) Influence du triton X-100 et du sodium cholate sur la cristallisation de BmrA E504A	259
<b>C. Discussion et conclusion</b>	262
<b>CHAPITRE 3 : Une nouvelle méthode de dosage des détergents par MALDI MS</b>	265
<b>A. Matériel et méthodes</b>	266
Matériel	266
Dosage des détergents seuls	266
Calcul du ratio MS détergent protoné/standard	267
Limite de détection du DDM et de la foscholine 12	268
Dosage de la FC12 et du DDM après dialyse	269
Dosage du DDM et du $\beta$ -OG mélangés	269
Estimation de la concentration de cholate	269
Dosage de la FC12 après concentration par ultrafiltration	269
Incubation de la FC12 avec la BSA	270
Dosage de détergents liés à différentes protéines membranaires	270
Calibration de la colonne Superdex 200	272
Estimation de la taille de la ceinture de détergent associé à BmrA	273
<b>B. Résultats</b>	274
Principe de la méthode de dosage des détergents par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof	274



Quantification des détergents seuls	275
a) Dosage de la foscholine 12	276
b) Dosage du $\beta$ -DDM	277
c) Dosage du $\beta$ -OG	279
d) Dosage du $C_4C_{12}$	281
e) Dosage du LMNG	281
f) Dosage du CHAPS	283
Limite de détection et application à l'étape de dialyse	285
Quantification des détergents dans un mélange	287
Les systèmes d'ultrafiltration peuvent concentrer les micelles libres de détergent	290
En présence de protéines membranaires, la quantité totale de détergent est détectée	291
Précision de la méthode	292
Dosage du détergent associé à BmrA et mP-gp purifiés	294
Dosage du détergent lié à d'autres protéines membranaires	303
La taille de la ceinture de détergent associé à BmrA	306
<b>C. Discussion et conclusion</b>	307
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	309

## TABLE DES FIGURES

---

Figure 1. La chimiorésistance des cellules cancéreuses peut être causée par une altération de l'expression des transporteurs membranaires.	28
Figure 2. Les mécanismes de résistance à de multiples drogues des cellules cancéreuses.	29
Figure 3. Structure chimique de quelques antibiotiques produits par des micro-organismes.	31
Figure 4. Les différentes classes d'antibiotiques et leur mécanisme d'action dans la bactérie.	32
Figure 5. Les mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques chez la bactérie.	34
Figure 6. Les familles de pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram positif et négatif.	36
Figure 7. La Structure cristallographique d'un transporteur de chaque système d'efflux MDR.	39
Figure 8. Le mécanisme d'efflux rotatif d'AcrB.	40
Figure 9. La topologie commune des transporteurs ABC.	42
Figure 10. Structure cristallographique du domaine NBD de l'histidine perméase.	48
Figure 11. Position des motifs conservés le long de la chaîne polypeptidique.	50
Figure 12. Représentations schématiques et exemples de structures de dimère de NBD.	54
Figure 13. Interactions de l'ATP avec les motifs consensus des domaines nucléotidiques.	56
Figure 14. Illustrations schématiques des liaisons établies avec l'AMPPNP (état initial) et l'ADP- $\text{AlF}_4^-$ (état transitoire).	58
Figure 15. Les deux modèles proposés pour le cycle catalytique d'hydrolyse de l'ATP.	59
Figure 16. Le repliement des domaines transmembranaires.	62
Figure 17. Les mécanismes de transport de médicaments par les exportateurs ABC.	64
Figure 18. Les conformations inward et outward facing durant le cycle de transport.	65
Figure 19. Structure cristallographique de BtuCD- $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ (1L7V, 2002) et interface entre les domaines TMD et NBD.	69
Figure 20. Structure cristallographique de BtuCD-F (2QI9, 2007).	70
Figure 21. Structure de BtuCD-F (EQNC) en complexe avec AMPPNP- $\text{Mg}^{2+}$ (4FI3, 2012).	71
Figure 22. Structure cristallographique de BtuCD (EQNC) en complexe avec AMPPNP- $\text{Mg}^{2+}$ (4R9U, 2014).	73
Figure 23. Structure cristallographique de HI1470/1 (2NQ2, 2007) et superposition avec BtuCD des TMs 4 et 5 (1L7V, 2002).	74
Figure 24. Structure cristallographique de HmuUV (4G1U, 2012) et superposition avec BtuCD (1L7V, 2002).	76

Figure 25. Le mécanisme de transport des importateurs de type II.	78
Figure 26. Structure cristallographique de MBP-MalFGK <sub>2</sub> -ATP (2R6G, 2007).	79
Figure 27. Structure cristallographique de MalFGK <sub>2</sub> apo (3FH6, 2009).	80
Figure 28. Structure cristallographique de MalFGK <sub>2</sub> -MBP (3PV0, 2011).	82
Figure 29. Structure cristallographique de ModB <sub>2</sub> C <sub>2</sub> (2ONK, 2007).	83
Figure 30. Structure cristallographique du transporteur MetNI (3DHW, 2008).	84
Figure 31. Les structures cristallographiques de Art(QN) <sub>2</sub> .	85
Figure 32. Le mécanisme de transport des importateurs de type I.	86
Figure 33. Structure cristallographique de Sav1866-ADP (2HYD, 2006).	89
Figure 34. Structures cristallographiques de MsbA.	90
Figure 35. Structures cristallographiques de la P-gp de <i>Mus musculus</i> .	92
Figure 36. Structure de P-gp de <i>C. elegans</i> (4F4C).	93
Figure 37. Comparaison des TMs 3, 4 et 5 des structures de P-gp de souris et <i>C. elegans</i> .	94
Figure 38. Comparaison des cartes de densité électronique de la P-gp de 2009 et 2013.	95
Figure 39. Validation des TMs 4, 5 et de l'hélice N-ter de la P-gp de 2013.	96
Figure 40. Structures cristallographiques de P-gp apo (2013) et en complexe avec Nb592.	98
Figure 41. Structure cristallographique de TM287/TM288-AMPPNP (3QF4).	100
Figure 42. Différences structurales entre les structures de TM287/288-AMPPNP et apo.	101
Figure 43. Flexibilité conformationnelle de la boucle D de NBD1.	102
Figure 44. Comparaison des structures d'ABCB10 en absence et présence de nucléotides.	104
Figure 45. Localisation des molécules de détergent dans les structures d'ABCB10.	105
Figure 46. Rôle d'Atm1 dans la synthèse des protéines fer-souffre.	106
Figure 47. Structures d'Atm1 apo et en complexe avec le glutathion.	107
Figure 48. Comparaison des structures d'Atm1 et NaAtm1.	108
Figure 49. Comparaison des structures de McjD et Sav1866 en complexe avec l'AMPPNP.	110
Figure 50. Structure cristallographique de CmABCB1-aCAP.	112
Figure 51. Changements conformationnels de MsbA et P-gp après hydrolyse de l'ATP.	115
Figure 52. Les différentes structures cristallographiques d'exportateurs ABC.	116
Figure 53. Le mécanisme hypothétique de transport des exportateurs ABC homodimériques.	117
Figure 54. Illustration de la bouée de détergent autour des protéines.	120
Figure 55. Les deux principaux types de cristaux des protéines membranaires.	124

Figure 56. Diagramme de phase et structures formées par un mélange monoléine/eau.	126
Figure 57. Le mécanisme de formation des cristaux de type I dans les phases cubiques lipidiques.	128
Figure 58. Modèle 3D de BmrA à 25 Å de résolution obtenu en absence de nucléotides par cryo-microscopie électronique.	132
Figure 59. Echange H/D de peptides visualisés sur des modèles 3D de BmrA.	133
Figure 60. Le principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.	197
Figure 61. Composition des principaux kits commerciaux utilisés.	199
Figure 62. Le principe de formation des bicelles.	200
Figure 63. Comparaison de l'expression et extraction de BmrA dans C43 (DE3) $\Delta$ AcrB à 20, 23 et 25°C.	203
Figure 64. Purification de BmrA sauvage en $\beta$ -DDM.	204
Figure 65. BmrA sauvage précipite lors de l'étape de concentration.	205
Figure 66. Aspect des gouttes de cristallisation de BmrA sauvage en DDM en fonction de la nature du PEG et du pH.	207
Figure 67. Aspect des gouttes de cristallisation de BmrA sauvage en DDM en fonction de la nature et la concentration du précipitant.	208
Figure 68. Purification de BmrA E504A en $\beta$ -DDM.	210
Figure 69. Le mutant E504A est plus stable en solution que la forme sauvage.	211
Figure 70. Purification de BmrA E504A en LMNG.	216
Figure 71. Etude de l'homogénéité de BmrA purifié en foscholine 12.	220
Figure 72. Spectres MALDI-TOF de BmrA E504A purifié en DDM et LMNG.	221
Figure 73. BmrA extrait en LMNG est échangé en FC12 sur colonne d'affinité au nickel.	223
Figure 74. Identification des adduits purifiés en LMNG et DDM.	224
Figure 75. Optimisation de l'extraction de BmrA E504A en triton X-100.	231
Figure 76. BmrA E504A est purifié par deux chromatographies d'affinité sur nickel agarose successives.	232
Figure 77. Analyse sur colonne d'exclusion de BmrA E504A purifié en $\beta$ -DDM-sodium cholate.	233
Figure 78. Spectre MALDI-TOF de BmrA E504A purifié en $\beta$ -DDM-sodium cholate.	234
Figure 79. Aspect des gouttes de cristallisation de BmrA E504A en DDM-sodium cholate en fonction des différents agents précipitants et ratios protéine-précipitant testés.	236
Figure 80. Conditions de cristallisation les plus prometteuses obtenues dans le kit PEG I pour la protéine BmrA E504A en $\beta$ -DDM-sodium cholate.	237
Figure 81. Aspect des gouttes de cristallisation de BmrA E504A en DDM-sodium cholate en fonction de différentes concentrations de PEG 200 à pH 6,5 et 7,0.	238

Figure 82. Clichés de diffraction enregistrés à 0 et 90°.	239
Figure 83. Analyse et identification des cristaux.	240
Figure 84. Elimination des contaminants par un gradient d'imidazole.	241
Figure 85. Influence du sel sur la cristallisation de BmrA E504A.	245
Figure 86. Influence de la technique d'ensemencement sur la cristallisation de BmrA E504A.	246
Figure 87. Aspect des gouttes de cristallisation de BmrA E504A en fonction de la nature et la concentration du PEG testé.	247
Figure 88. Influence de [KCl] sur la cristallisation de BmrA E504A.	249
Figure 89. Influence de [BmrA] sur la cristallisation de BmrA.	250
Figure 90. Influence du ratio protéine/précipitant sur la cristallisation de BmrA.	251
Figure 91. Influence du pH sur la cristallisation de BmrA.	252
Figure 92. Cristallisation de BmrA E504A en présence d'additifs.	253
Figure 93. Cristallisation de BmrA en présence de détergents calixarène et clamps.	255
Figure 94. Cristallisation de BmrA E504A en présence de substrats.	257
Figure 95. Effet du chlorure de potassium sur la purification et la cristallisation de BmrA E504A.	259
Figure 96. Influence du triton X-100 et du sodium cholate sur la cristallisation de BmrA E504A.	261
Figure 97. Stratégies pour améliorer la cristallisation de BmrA E504A.	263
Figure 98. Calcul du ratio MALDI-MS détergent protoné/standard.	268
Figure 99. Calibration de la colonne Superdex 200.	273
Figure 100. Estimation de la taille de la ceinture de détergent associé à BmrA.	274
Figure 101. Le principe de la méthode de dosage des détergents par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof.	275
Figure 102. Dosage par MALDI MS de la foscholine 12 protonée (FC12 <sup>H</sup> ) par la foscholine 12 deutérée (FC12 <sup>D</sup> ).	277
Figure 103. Dosage par MALDI MS du DDM <sup>H</sup> par le DDM <sup>D</sup> .	278
Figure 104. Dosage par MALDI MS du $\beta$ -OG <sup>H</sup> par le $\beta$ -OG <sup>D</sup> .	279
Figure 105. Dosage par MALDI MS du C <sub>4</sub> C <sub>12</sub> par le C <sub>4</sub> C <sub>10</sub> .	281
Figure 106. Dosage par MALDI MS du LMNG par le DMNG.	282
Figure 107. Dosage par MALDI MS du CHAPS par le CHAPSO.	284
Figure 108. Limite de détection des détergents et application à l'étape de dialyse.	286
Figure 109. Dosage du DDM et du $\beta$ -OG mélangés par MALDI MS.	287
Figure 110. Influence du NaCl sur la désorption du cholate.	289

Figure 111. Compatibilité des différents systèmes d'ultrafiltration avec la FC12.	291
Figure 112. La méthode MALDI MS dose la quantité totale de détergent présent.	292
Figure 113. Dosage du DDM associé à SERCA1a par radioactivité et MALDI MS.	293
Figure 114. Dosage de la quantité de détergent libre et lié à BmrA pendant sa purification.	294
Figure 115. Dosage de la FC12 libre et liée à BmrA après gel filtration sur Superdex 200.	296
Figure 116. Dosage du DDM libre et lié à BmrA après gel filtration sur Superdex 200.	298
Figure 117. Dosage du LMNG libre et lié à BmrA après gel filtration sur Superdex 200.	299
Figure 118. Dosage du DDM libre et lié à mP-gp après gel filtration sur Superdex 200.	300
Figure 119. Désorption du cholate dans les échantillons de mP-gp purifié.	302
Figure 120. Quantification du détergent associé à différentes protéines membranaires.	305
Figure 121. Estimation de la taille de la couronne de détergent associé à BmrA.	306

## TABLE DES TABLEAUX

---

Tableau 1. Classification des transporteurs ABC humains.	44
Tableau 2. Transporteurs ABC impliqués dans des pathologies humaines.	45
Tableau 3. Séquences et fonctions des différents motifs conservés des NBDs.	49
Tableau 4. Les structures cristallographiques des NBDs de transporteurs ABC.	51
Tableau 5. Asymétrie des motifs conservés chez plusieurs transporteurs ABC eucaryotes.	61
Tableau 6. Les structures cristallographiques d'importateurs ABC.	67
Tableau 7. Les structures cristallographiques d'exportateurs ABC.	87
Tableau 8. Structure et caractéristiques des principaux détergents utilisés pour la solubilisation, purification et cristallisation des protéines membranaires.	121
Tableau 9. Les différentes conditions d'expression, purification et cristallisation des exportateurs ABC.	123
Tableau 10. Les différentes méthodes de dosage des détergents.	126
Tableau 11. Quelques substrats de BmrA et leur affinité.	130
Tableau 12. Les stratégies envisagées pour éliminer les contaminants OmpF et AcrB.	146
Tableau 13. Composition des gels SDS-PAGE Tris-tricine.	198
Tableau 14. Essais de cristallisation réalisés sur BmrA purifié en $\beta$ -DDM et LMNG.	202
Tableau 15. Conditions de cristallisation obtenues pour BmrA E504A purifié en $\beta$ -DDM.	213
Tableau 16. Conditions de cristallisation obtenues pour BmrA E504A en LMNG.	218
Tableau 17. Criblage des conditions de cristallisation réalisé avec BmrA E504 en DDM-sodium cholate.	229
Tableau 18. Essais de cristallisation réalisés avec BmrA E504A purifié dans différentes conditions.	230
Tableau 19. Dosage du détergent associé à différentes protéines membranaires purifiées.	304

## ABRÉVIATIONS

---

<b>aCAP</b>	Anti-CmABCB1 Peptide
<b>ABC</b>	ATP-Binding Cassette
<b>AcrA</b>	Acriflavine Resistance Protein A
<b>AcrB</b>	Acriflavine Resistance Protein B
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ADP</b>	Adénosine Di-Phosphate
<b>ATA1</b>	Amino acid Transporter system A1
<b>ATP</b>	Adénosine Tri-Phosphate
<b>AMP</b>	Adénosine MonoPhosphate
<b>AMPPNP</b>	Adénosine-5'-( $\beta$ - $\gamma$ -imido) triphosphate
<b>APS</b>	Persulfate d'ammonium
<b>ARNm</b>	Acide RiboNucléique messenger
<b>ARNt</b>	Acide RiboNucléique de Transfert
<b>ATP</b>	Adénosine Tri-Phosphate
<b>BCA</b>	Acide Bicinchoninique
<b>BCRP</b>	Breast Cancer Resistance Protein
<b>BPD</b>	Binding Protein-Dependent
<b>BER</b>	Base Excision Repair
<b>BmrA</b>	Bacillus Multidrug Resistance ATP
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>C12E8</b>	Octaethylene glycol monododecyl ether
<b>CDR</b>	Complementarity Determining Region
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
<b>CHAPS</b>	3-[(3-CHolamidopropyl)diméthylAmino]-1-PropaneSulfonate
<b>CMC</b>	Concentration Micellaire Critique
<b>CTR1</b>	Copper Transporter 1
<b>CYPs</b>	CYtochromes P450
<b>DDM</b>	n-DoDécyl- $\beta$ -Maltoside
<b>DHF</b>	DiHydroFolate
<b>DM</b>	DécylMaltoside
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DRM2</b>	Drug Resistance Mechanism and Modulation
<b>DTT</b>	DiThioTréithol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid
<b>ERCC1</b>	Excision Repair Cross-Complementing 1
<b>ESRF</b>	Synchrotron " <i>European Synchrotron Radiation Facility</i> "
<b>FC12</b>	Fos Choline 12
<b>GSH</b>	Glutathion réduit



<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé
<b>GST</b>	Glutathion S-Transférase
<b>Hepes</b>	N-[2-HydroxyEthyl]Piperazidin-N'-[2-EthanSulfonic acid]
<b>His<sub>6</sub></b>	Hexahistidine
<b>Hoechst 33342</b>	2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole
<b>HUGO</b>	HUman Genome Organisation
<b>ICL</b>	IntraCellular Loop
<b>IPTG</b>	IsoPropyl-β-D-Thio-Galactopyranoside
<b>ISC</b>	Iron-Sulfur-Cluster
<b>Kd</b>	Constante de dissociation
<b>Kda</b>	Kilo Dalton
<b>Km</b>	Constante de Michaelis –Menten
<b>LAT1</b>	L-type amino acid transporter 1
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LDAO</b>	LaurylDiméthylAminoOxide
<b>LmrA</b>	<i>Lactococcus</i> Multidrug Resistance
<b>MALDI-MS</b>	Matrix-Assisted UV-Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry
<b>MAD</b>	Multiple-wavelength Anomalous Diffraction
<b>MATE</b>	Multidrug And Toxic compound Extrusion
<b>Mccj25</b>	Microcine J25
<b>MDR</b>	MultiDrug Resistance
<b>MFP</b>	Membrane Fusion Protein
<b>MFS</b>	Major Facilitator Superfamily
<b>MGMT</b>	O(6)-methylguanine-DNA methyltransférase
<b>MMR</b>	MisMatch Repair
<b>MRP</b>	Multidrug Resistance-associated Protein
<b>MVP/LRP</b>	Major Vault/Lung Resistance related Protein
<b>MW</b>	Molecular Weight
<b>NBD</b>	Nucleotide Binding Domain
<b>NER</b>	Nucleotide Excision Repair
<b>NHEJ</b>	Non-Homologue End-Joining
<b>OATs</b>	Organic Anion Transporters
<b>OATPs</b>	Organic Anion Transporting Polypeptides
<b>OCTs</b>	Organic Cation Transporters
<b>OG</b>	OctylGlucoside
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>OPM</b>	Orientation of protein in membrane
<b>VO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Orthovanadate
<b>PABA</b>	Acide Para-Amino Benzoïque
<b>PAGE</b>	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
<b>PC</b>	PhosphatidylCholine
<b>PDB</b>	Protein Data Bank

<b>PE</b>	PhosphatidylEthanolamine
<b>PEG</b>	Polyéthylène Glycol
<b>PEPTs</b>	Oligopeptide transporters
<b>P-gp</b>	P-GlycoProtein
<b>Pi</b>	Phosphate libre
<b>P-loop</b>	Phosphate binding loop
<b>PMSF</b>	PhenylMethaneSulphonylFluoride
<b>MRP1</b>	Multidrug Resistance Protein 1
<b>RND</b>	Resistance Nodulation Division
<b>Rpm</b>	Rotations par minute
<b>SAD</b>	Single wavelength Anomalous Diffraction
<b>SBP</b>	Substrate-Binding Protein
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>shRNA</b>	Short Hairpin RNA
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>SLC</b>	SoLute Carrier
<b>SMR</b>	Small Multidrug Resistance
<b>TAP</b>	Transporter associated with Antigen Processing
<b>TEMED</b>	N,N,N,N-TetraMethylEthylene Diamine
<b>TMD</b>	TransMembrane Domain
<b>Tris</b>	Trishydroxyméthylaminométhane
<b>Triton X-100</b>	Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether
<b>UDM</b>	n-UnDécyl- $\beta$ -Maltoside
<b>(v/v)</b>	Volume/volume
<b>(w/v)</b>	Poids/volume

## **AVANT-PROPOS**

Le cancer demeure un grave problème de santé publique en France mais également dans le monde. L'OMS estime à 8,2 millions le nombre de décès survenus, dans le monde, à cause du cancer en 2012 et son incidence ne cesse d'augmenter (14,1 millions de nouveaux cas en 2012 contre 12,7 millions en 2008). D'après les projections, la mortalité liée au cancer va continuer à augmenter pour dépasser, selon les estimations, 13,1 millions de décès en 2030.

Il existe trois traitements majeurs pour lutter contre cette maladie, la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cette dernière est quelque fois la seule capable de traiter certains cancers tels que la leucémie ou les cancers métastasés. Cependant, des phénomènes de résistance à ces traitements chimiothérapeutiques rendent certains cancers non traitables. Ce phénomène, appelé phénotype de résistance à de multiples drogues (MDR) est caractérisé par une diminution de la sensibilité des cellules tumorales vis-à-vis non seulement de la drogue chimiothérapeutique utilisée, mais également d'un large ensemble d'autres drogues sans homologie évidente de structure ni de spécificité. Cette résistance peut être due à différents mécanismes dont l'un des principaux est la surexpression de transporteurs ABC dont les trois plus impliqués chez l'homme sont ABCB1 (aussi appelé P-gp « P-glycoprotein »), ABCC1 (ou MRP1 « multidrug resistance protein 1») et ABCG2 (ou BCRP « breast cancer resistance protein »). Leur étude fonctionnelle et structurale ainsi que la recherche d'inhibiteurs spécifiques, dans le but de réduire l'export des agents anticancéreux hors des cellules tumorales qui les surexpriment, est au cœur des recherches effectuées au sein de l'équipe DRM2 « Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Médicaments ».

Ces protéines membranaires utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour exporter leurs substrats à l'encontre d'un gradient de concentration. Ce sont des transporteurs polyspécifiques dont les substrats sont endogènes ou exogènes. Leur organisation structurale est très conservée ; la pompe est généralement composée de deux domaines de fixation des nucléotides qui interviennent dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, et de deux domaines transmembranaires impliqués dans la reconnaissance des drogues et leur translocation. Le génome humain comporte 48 transporteurs répartis en sept familles notées de ABCA à ABCG.

Le phénotype MDR, découvert chez les cellules cancéreuses humaines, s'est également avéré pertinent chez les bactéries. Comme chez l'Homme, des pompes d'efflux sont à l'origine de ce phénomène, capables d'expulser hors de la cellule des xénobiotiques de structure et composition chimique très différentes. La surexpression de tels transporteurs constitue pour la bactérie une arme de défense très efficace. Les transporteurs utilisant la force proton-motrice comme source d'énergie ont longtemps été considérés comme les seuls responsables du phénotype MDR chez les bactéries, mais en 1996, Konings et Van Veen découvrirent qu'un transporteur de type ABC, LmrA, confère un phénotype MDR chez *Lactococcus lactis* (Van Veen et Konings, 1996). Le séquençage de génomes bactériens a ensuite permis de décrire d'autres transporteurs ABC capables de transporter des antibiotiques : Sav1866 de *Staphylococcus aureus* ou encore BmrA de *Bacillus subtilis*.

Les structures tridimensionnelles de transporteur ABC récemment résolues ont permis de fournir quelques indications sur le mécanisme de transport des drogues chimiothérapeutiques, mais malgré cela, beaucoup de paramètres restent encore mal compris comme le couplage entre l'hydrolyse de l'ATP et l'export de drogues. Il est donc essentiel de déterminer des structures supplémentaires de transporteurs ABC, en particulier en complexe avec des agents anticancéreux. Ceci constituerait un point de départ crucial pour la mise au point de nouveaux inhibiteurs spécifiques, permettant la restauration de l'efficacité des traitements antibiotiques et anticancéreux.

La première partie de ma thèse s'est donc portée sur l'étude cristallographique de la protéine BmrA de *Bacillus subtilis*, isolée et caractérisée comme un transporteur bactérien de multiples drogues. Il partage 30 % d'identité et plus de 50 % de forte similarité de séquence avec les moitiés N- et C- terminales de la glycoprotéine-P ainsi qu'avec le demi-transporteur MsbA. Il fixe une grande variété de substrats de structures non apparentées dont ceux de la P-gp (des drogues chimiothérapeutiques comme la doxorubicine, la daunorubicine et la rhodamine 6G) et de LmrA (des antibiotiques comme la clindamycine et la spiramycine). Ce transporteur, exprimé fonctionnellement en quantités très importantes dans *E. coli*, nous sert ainsi de modèle dans la compréhension du mécanisme de transport des substrats à travers la membrane. Le chapitre 2 sera consacré à son étude structurale.

Environ 20 000 structures uniques de protéines ont été résolues à ce jour, dont seulement 300 correspondent à des protéines membranaires, ce qui illustre bien la difficulté qu'il y a à étudier ce type de protéines. Cette difficulté est présente à chaque étape du processus d'étude : expression analytique et quantitative, instabilité en solution dès l'extraction et durant la purification jusqu'à la cristallisation. Les détergents sont des molécules amphiphiles dotées d'une partie hydrophobe et d'une autre hydrophile qui permettent à la fois une interaction avec la région hydrophobe des protéines et le maintien en solution du complexe protéine-détergent ainsi formé.

Une information-clé lorsqu'on purifie ou cristallise une protéine membranaire est de connaître la concentration réelle du détergent présent dans le milieu, largement dépendante de la protéine membranaire d'intérêt et influençant directement le niveau d'agrégation, la cristallogenèse, la stabilité du cristal et son degré de diffraction. Il n'existait jusqu'à présent aucune méthode qui permette d'obtenir cette information en routine, rapidement, et avec un détergent quelconque. La seconde partie de ma thèse concerne ainsi le développement d'une nouvelle technique de dosage des détergents qui est basée sur la spectrométrie de masse de type MALDI (matrix-assisted UV-laser desorption ionization mass spectrometry). Cette méthode permet de déterminer avec précision et sensibilité la concentration de détergent libre et lié aux protéines membranaires, en une seule étape. Le chapitre 3 sera consacré au principe, à la validation et aux applications de cette méthode qui devrait faciliter l'étude structurale et fonctionnelle des protéines membranaires en général.

# **CHAPITRE 1 :**

## **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## I. LE PHENOTYPE DE RESISTANCE AUX MEDICAMENTS (MDR)

L'exposition constante à un environnement hostile a conduit les cellules à développer des mécanismes d'adaptation, de résistance ou de défense contre les diverses agressions extérieures. Ce phénomène de résistance est aujourd'hui à l'origine d'un vrai problème de santé publique et menace l'efficacité de nombreux médicaments utilisés dans le traitement de maladies comme le cancer ou les maladies microbiennes transmises par les bactéries, les champignons, les levures ou les parasites. Nous présenterons dans cette partie les origines de ce phénomène et décrirons les mécanismes qui lui sont associés.

### A. **CANCER ET RESISTANCE A LA CHIMIOTHERAPIE**

#### **Cancer et traitements**

Le cancer est une maladie qui apparaît suite à la modification génétique d'une cellule de l'organisme. Ce dérèglement entraîne une prolifération cellulaire rapide et anormalement importante au sein d'un tissu. La cellule met en place des processus d'échappement aux systèmes de réparation de l'ADN et à l'apoptose. Le cycle cellulaire devient incontrôlable et résulte en la formation d'une tumeur primitive, pouvant évoluer en métastases si les cellules atteintes se propagent via la circulation sanguine ou lymphatique à une autre partie du corps.

Il existe à ce jour trois traitements pour lutter contre cette maladie :

- ⊕ **La chirurgie**, utilisée dans 80 % des cas, est préconisée dans le cas de tumeurs dites solides, non métastatiques. Le tissu tumoral est alors retiré.
- ⊕ **La radiothérapie** consiste en l'utilisation de rayons X ou gamma à haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses. Ils peuvent être appliqués de manière très localisée afin de préserver les tissus sains avoisinants. La radiothérapie peut être utilisée après la chirurgie pour cibler les cellules cancéreuses pouvant résister dans la zone opérée.
- ⊕ **La chimiothérapie** consiste à traiter les cellules cancéreuses par des produits chimiques cytotoxiques entraînant l'apoptose des cellules ou le blocage de leur prolifération.

En cas de métastases, la chimiothérapie reste la seule possibilité de traitement. Néanmoins, les médecins se heurtent fréquemment à des cancers résistants à ce type de thérapie. Les cellules peuvent soit présenter une résistance intrinsèque à la tumeur (établie avant tout traitement) soit acquérir une résistance à de multiples drogues au cours de la chimiothérapie, entraînant son échec. Ce phénomène de résistance pleiotropique aux drogues ou phénotype MDR (« Multi Drug Resistance ») fut décrit pour la première fois en 1970 par Biedler et Rhiem. Ils démontrèrent sur une lignée cellulaire de cancer du poumon

d'hamster maintenue en culture en présence de concentrations croissantes d'actinomycine D, que des cellules cancéreuses ainsi sélectionnées développent une résistance non seulement à l'agent de sélection mais également à un large ensemble d'agents cytotoxiques sans homologie de structure ni de spécificité et auxquelles les cellules n'ont jamais été exposées (Biedler et Rhiem, 1970).

### Les mécanismes de résistance à la chimiothérapie

Plusieurs mécanismes moléculaires expliquant la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques ont été découverts ces vingt dernières années. Les six principaux sont décrits ci-après.

#### a) Influence de l'environnement tumoral

En 1990, Teicher mit pour la première fois en évidence le rôle de l'environnement tumoral dans la résistance au cisplatine. Des cellules de carcinome mammaire ont été greffées chez des souris et ensuite traitées par des agents cytotoxiques afin de créer une chimiorésistance. Les cellules tumorales chimiorésistantes sont prélevées sur des animaux et cultivées *in vitro*. Elles retrouvent alors un phénotype chimiosensible. Ces mêmes cellules réimplantées chez des souris présentent de nouveau une chimiorésistance *in vivo* (Teicher et *al.*, 1990).

Plusieurs équipes ont aujourd'hui montré qu'il existe une communication étroite et complexe entre les cellules cancéreuses et celles du stroma (fibroblastes, cellules immunitaires et endothéliales) qui tend à rendre les cellules cancéreuses plus propices au développement tumoral (Whatcott et *al.*, 2013). En sécrétant des protéines de la matrice extracellulaire et des facteurs solubles à activité pro-tumorale, les cellules stromales activent des cascades de voies de signalisation dans les cellules cancéreuses favorisant leur survie (Agarwal et Kaye, 2003) et la résistance aux chimiothérapies (Castells et *al.*, 2012).

L'équipe du Dr. Mirshahi a identifié en 2009 de nouvelles cellules stromales appelées Hospicells qui proviennent de la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse et qui sont présentes dans les liquides d'ascites des malades atteints de cancers. Ces cellules ont la propriété de fixer un grand nombre de cellules cancéreuses et de les protéger de l'action de la chimiothérapie. Leur étude montre par microscopie électronique qu'il existe des zones de fusion entre les membranes des hospicells et des cellules tumorales ovariennes, permettant aux deux cellules d'échanger une partie de leur membrane plasmique. Le transfert de protéines ABC exprimées par les hospicells vers les cellules tumorales par trogocytose permettrait l'acquisition de la chimiorésistance (Rafii et *al.*, 2008).

Une récente étude publiée dans la revue Nature montre que les cellules tumorales sont capables d'interagir avec des cellules du système immunitaire, les cellules myéloïdes. Celles-ci produisent une cytokine pro-inflammatoire très active IL-1RA qui bloque la cascade de signalisation induite par les agents chimiothérapeutiques en inhibant l'interleukine IL-1 $\alpha$ , ce qui empêche l'entrée en apoptose des cellules cancéreuses. En inhibant le recrutement des cellules myéloïdes, les cellules tumorales redeviennent sensibles à un traitement au do-



cétaxel (Di Mitri et *al.*, 2014). L'ensemble de ces travaux montrent l'importance de la prise en charge de l'environnement tumoral en association aux cytotoxiques conventionnels.

## **b) Inactivation des médicaments**

Les médicaments anticancéreux peuvent être rendus inactifs par des mécanismes de détoxification. Les cytochromes P450 (CYPs) sont les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Des études ont montré que CYP1B1 est surexprimé dans les tumeurs du sein, du poumon, du cerveau, des testicules (Murray et *al.*, 1997) et qu'il est impliqué dans le métabolisme du docétaxel et de la mitoxantrone (Crommentuyn et *al.*, 1998), de l'ellipticine (Stiborova et *al.*, 2001) et du tamoxifène (Rochat et *al.*, 2001). Dans le traitement de l'ostéosarcome, un autre cytochrome, CYP3A est lui responsable de la résistance à plusieurs agents anticancéreux comme l'ifosfamide, la vinblastine, l'étoposide et la doxorubicine (Dhaini et *al.*, 2003).

Les glutathion S-transférase (GST) sont des enzymes qui conjuguent le glutathion (GSH) à une grande variété de xénobiotiques (des mutagènes, des agents cancérogènes et des médicaments) afin de les éliminer. Plusieurs études ont montré que la surexpression de la glutathion S-transférase pi est corrélée à une résistance à la chimiothérapie à base de cisplatine (Arai et *al.*, 1997) (Nakanishi et *al.*, 1999). Il a été montré que des cellules CD34+ humaines transduites avec la glutathion S-transférase pi sont aussi plus résistantes à la doxorubicine et au cyclophosphamide (Kuga et *al.*, 1997).

Les métallothionéines sont de petites protéines riches en cystéine capables de chélater les cations divalents. Elles jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie des ions métalliques comme le cuivre et le zinc, la détoxification des métaux lourds et protègent la cellule contre le stress oxydant (Feng et *al.*, 2006). Une étude a montré que la surexpression de la métallothionéine 2A diminue la sensibilité des cellules d'ostéosarcome à la chimiothérapie directement par chélation du platine (cisplatine) ou indirectement dans le cas des drogues sans ion métallique (doxorubine et vincristine) par chélation de l'atome de zinc de la protéine p53. En revanche, la diminution d'expression de la métallothionéine 2A par un shRNA augmente la sensibilité des cellules à la doxorubicine, la vincristine et au cisplatine (Habel et *al.*, 2013).

## **c) Réparation de l'ADN**

Afin d'échapper à la cytotoxicité des agents anticancéreux, la cellule tumorale dispose de plusieurs systèmes pour réparer les dommages créés sur l'ADN :

- ⊕ La réversion directe des dommages de l'ADN ;
- ⊕ La réparation par excision de base (BER, « Base Excision Repair ») ;
- ⊕ La réparation par excision de nucléotide (NER, « Nucleotide Excision Repair ») ;
- ⊕ La réparation de mésappariements (MMR, « MisMatchA Repair ») ;
- ⊕ La recombinaison homologue ;
- ⊕ La liaison d'extrémités sans homologie (NHEJ, « Non-Homologue End-Joining »).

Ces mécanismes de réparation permettent de contrer l'effet des drogues et conduisent à des phénomènes de résistance. Des travaux réalisés *in vitro* sur des cellules cancéreuses de mélanome montrent qu'une surexpression de la MGMT (« O(6)-methylguanine-DNA methyltransférase »), enzyme impliquée dans la voie de réparation directe de l'ADN, est associée à une augmentation de la résistance à la fotémustine (Passagne et *al.*, 2006). Une étude montre que la voie de réparation des mésappariements est impliquée dans la résistance à de nombreux anticancéreux (Lage et Dietel, 1999). Il a été observé une augmentation de la voie du BER dans des cellules de mélanome résistantes à l'étoposide ou au cisplatine (Runger et *al.*, 2000). Il a été démontré que la protéine ERCC1 (« Excision Repair Cross Complementing 1 ») du système NER est impliquée dans la reconnaissance des lésions de l'ADN causées *in vitro* par le cisplatine (Li et *al.*, 2000) et que la réduction de son expression augmente la cytotoxicité du cisplatine dans des cellules cancéreuses de l'ovaire (Selvakumaran et *al.*, 2003). L'expression d'une autre protéine du NER (ERCC2) est directement corrélée à la résistance aux agents alkylants dans plusieurs lignées tumorales humaines (Chen et *al.*, 2002). Enfin, une récente étude montre que la spironolactone, une molécule déjà utilisée dans le traitement de l'hypertension, permettrait de potentialiser la chimiothérapie en bloquant la voie de réparation par recombinaison homologue des cellules cancéreuses (Shahar et *al.*, 2014).

#### d) Résistance à l'apoptose

Les lésions induites par les agents chimiothérapeutiques, si elles ne sont pas réparables, conduisent à la mort cellulaire programmée ou apoptose. Mais dans la plupart des cancers, plusieurs protéines impliquées dans ce processus subissent des mutations. La protéine p53, facteur de transcription qui joue un rôle central dans la défense de l'intégrité cellulaire, est mutée dans près de la moitié des cancers humains. Son inactivation entraîne une diminution de la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux (Vousden et Lane, 2007). La surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est rapportée dans un grand nombre de cancers et associée à une résistance à la doxorubicine, au taxol et à la mitoxantrone (Adams et *al.*, 1998). La perte d'expression de la protéine Bax, un des effecteurs de l'apoptose, entraîne une progression tumorale accrue et une résistance des cellules cancéreuses du colon au sulindac (Zhang et *al.*, 2000). Une diminution de la sensibilité cellulaire vis-à-vis de 122 agents anticancéreux a été corrélée à une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x<sub>L</sub> (Amundson et *al.*, 2000). Deux inhibiteurs de Bcl-x<sub>L</sub>, le ABT-263 et le ABT-737, permettent de sensibiliser des cellules cancéreuses de la prostate initialement chimio-résistantes au docétaxel (Tamaki et *al.*, 2014).

#### e) Mutation de la cible cellulaire

La cible des médicaments anticancéreux peut muter, celle-ci n'est alors plus reconnue par le cytotoxique. C'est par exemple le cas des vinca alcaloïdes (vincristine, vinblastine, vindésine, et vinorelbine), des agents anticancéreux qui inhibent l'assemblage des microtubules et bloquent le cycle cellulaire en phase G2 tardive. Leur résistance est le fait de mutations au niveau des sites de fixation de la tubuline (Kavallaris et *al.*, 2001). Plusieurs études

ont montré que des mutations de la topoisomérase I et II confèrent une résistance respectivement aux dérivés de la camptothécine (topotecan et irinotécan) (Pan et *al.*, 2013) et à l'étoposide (Lage et *al.*, 2000 ; Wu et *al.*, 2011). Des mutations dans le gène codant pour la dihydrofolate réductase entraîne une résistance au méthotrexate dans plusieurs lignées cellulaires de cancer de l'ovaire (Dicker et *al.*, 1990).

## f) Concentration du médicament insuffisante pour inhiber sa cible

### (1) Réduction de l'afflux des drogues

Les transporteurs SLCs (« SoLute Carriers ») utilisent le transport actif secondaire pour importer une variété de substrats (ions, sucres, acides aminés, neurotransmetteurs, métaux, phosphates, oligopeptides nucléosides et vitamines hydrosolubles) (Rask-Andersen et *al.*, 2013). La superfamille des protéines SLCs compte aujourd'hui près de 400 membres répartis en 52 sous-familles<sup>1</sup> (Hediger et *al.*, 2004). Les SLCs transportent un large panel de médicaments anticancéreux (Sprowl et *al.*, 2012). La résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques est souvent associée à une diminution de l'expression des transporteurs SLCs (tels que SLC7A5 et SLC19A1) impliqués dans l'import d'anticancéreux (figure 1) (Januchowski et *al.*, 2013). En revanche, d'autres transporteurs tels que SLC2A9 et SLC38A4, qui assurent l'entrée des nutriments dans le cytoplasme sont surexprimés, ce qui permet aux cellules cancéreuses de bénéficier d'un avantage pour leur croissance par rapport aux cellules normales (Januchowski et *al.*, 2014).

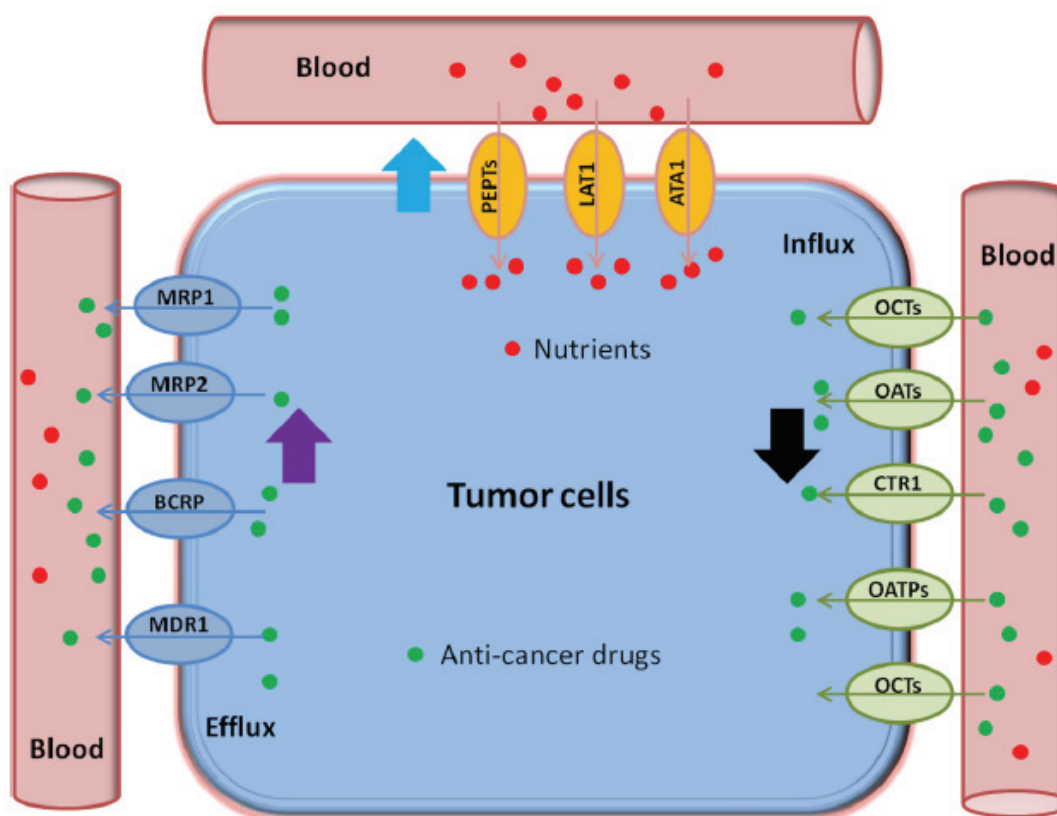
### (2) Efflux actif de l'agent anticancéreux

Juliano et Ling ont découvert en 1976 que la résistance aux médicaments dans des cellules cancéreuses en culture était corrélée à la surexpression d'une protéine membranaire de 170 kDa, qu'ils ont appelé glycoprotéine-P (P-gp, MDR1, ABCB1), (Juliano et Ling, 1976). Cette protéine fait aujourd'hui partie de la superfamille des transporteurs ABC (« ATP-Binding Cassette »). Ces pompes d'efflux membranaires utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter une grande diversité de molécules dont des médicaments anticancéreux vers l'extérieur des cellules (figure 1). Deux autres transporteurs sont impliqués dans le phénotype MDR chez l'homme, la *multiresistance protein 1* (MRP1, ABCC1) (Cole et *al.*, 1992) et la *breast cancer resistance protein* (BCRP, ABCG2), (Doyle et *al.*, 1998; Allikmets et *al.*, 1998; Miyake et *al.*, 1999). De récentes études ont montré l'implication d'autres transporteurs ABC dans ce phénotype comme MRP2 (ABCC2), (Hinoshita et *al.*, 2000; Matsumoto et *al.*, 2005) et MRP4 (ABCC4), (Lee et *al.*, 2000; Tian et *al.*, 2005).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de deux transporteurs du cuivre, ATP7A et ATP7B, dans la résistance aux dérivés du platine. La surexpression d'ATP7B dans des cellules de carcinome épidermoïde humain est corrélée à la résistance au cisplatine (Komatsu et *al.*, 2000). Chez des patientes atteintes de carcinomes ovariens et traitées au cisplatine, la surexpression d'ATP7B est associée à un plus mauvais pronostic clinique que celles présentant une plus faible expression d'ATP7B (Nakayama et *al.*, 2001). L'implication d'ATP7A est

<sup>1</sup> <http://www.bioparadigms.org/slc/intro.htm>

liée à sa capacité à séquestrer les dérivés du platine dans des vésicules (Samimi et *al.*, 2004). La protéine MVP/LRP (« Major Vault/Lung Resistance-related protein ») est également impliquée dans le phénotype MDR. Berger et ses collaborateurs ont montré une corrélation entre la surexpression de la protéine MVP et la résistance de cellules tumorales astrocytaires aux anthracyclines, au cisplatine et à l'étoposide (Berger et *al.*, 2001). Sa fonction reste encore peu comprise, elle pourrait être impliquée dans le transport nucléocytoplasmique des drogues (Han et *al.*, 2012) et de leur séquestration au sein de vésicules (Izquierdo et *al.*, 1998).



**Figure 1 : La chimiorésistance des cellules cancéreuses peut être causée par une altération de l'expression des transporteurs membranaires.**

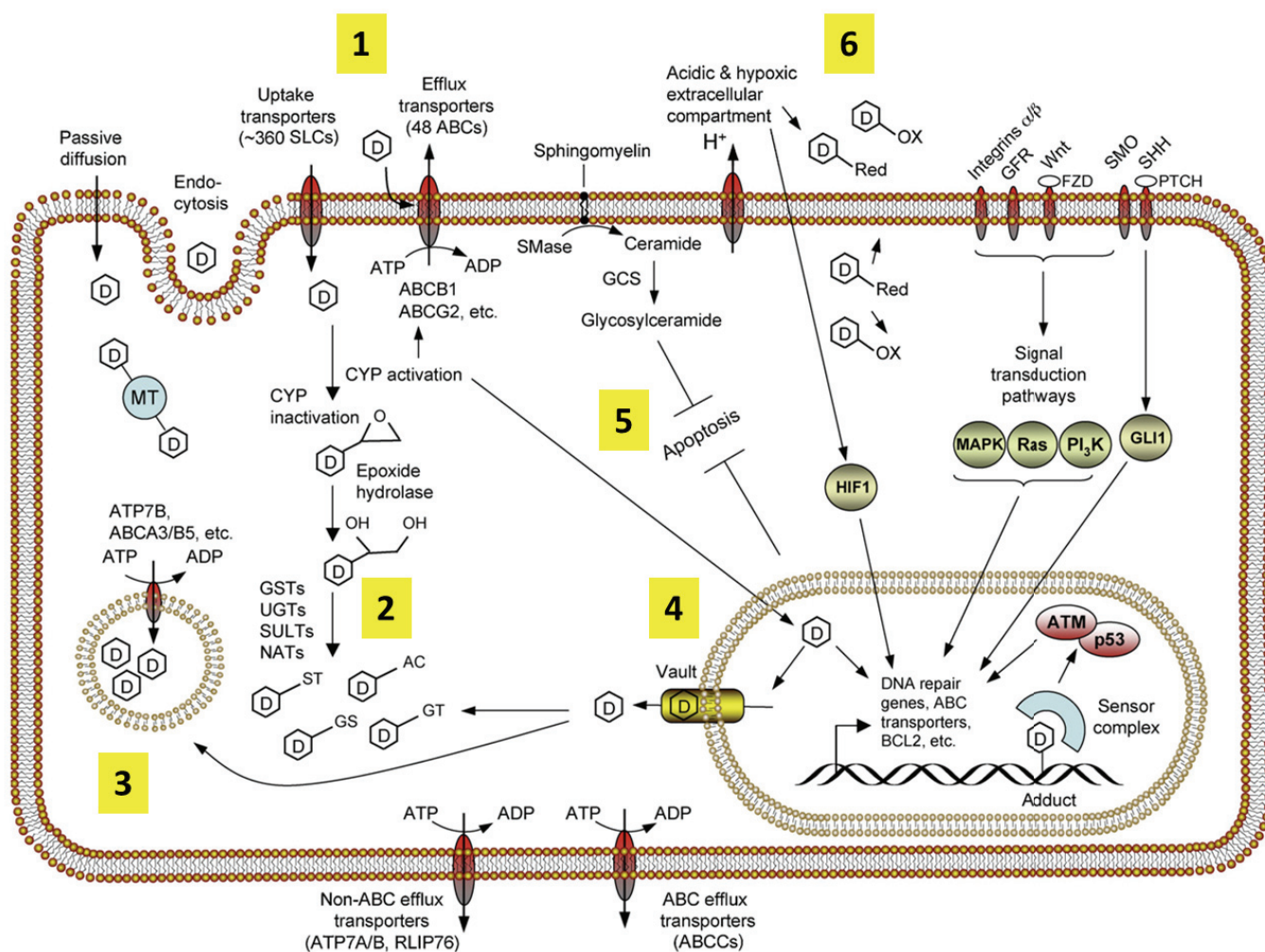
D'après Li et Shu, 2014.

Les transporteurs SLCs impliqués dans l'import d'anticancéreux sont colorés en vert (OCTs « Organic Cation Transporters », OATs « Organic Anion Transporters », CTR1 « Copper Transporter 1 », OATPs « Organic Anion Transporting Polypeptides »). Les transporteurs SLCs de nutriments sont colorés en jaune (PEPTs « Oligopeptide transporters », LAT1 « L-type amino acid transporter 1 », ATA1 « Amino acid Transporter system A1 »). Les transporteurs ABC impliqués dans l'efflux des drogues sont colorés en bleu (MRP1, MRP2, BCRP et MDR1). La diminution de l'expression des transporteurs SLCs (flèche noire) et la surexpression des transporteurs ABC (flèche violette) confèrent la chimiorésistance aux cellules cancéreuses. La surexpression des transporteurs SLCs de nutriments (flèche bleue) contribue à la résistance et à la croissance des cellules tumorales.

### g) Compartimentation dans les organites

La séquestration des drogues à l'intérieur de vésicules ou d'organites cytoplasmiques comme les lysosomes ou les endosomes constitue un mécanisme important de résistance (Gotink et *al.*, 2011). Les agents anticancéreux comme les anthracyclines ou les vinca-alcaloïdes sont des bases faibles avec un pKa proche de 7. Au pH cytoplasmique (pH  $\approx$  7,2), une partie de ces molécules sont non chargées, ce qui leur permet de traverser la bicouche lipidique des organites subcellulaires. L'insertion des drogues dans des compartiments acides (pH 4-5) comme le réseau *trans*-golgien, les lysosomes ou les vésicules sécrétoires entraîne leur conversion en une forme chargée qui ne peut plus retraverser la membrane interne (Gong et *al.*, 2003). La cellule cancéreuse élimine ensuite par exocytose les vésicules dans lesquelles sont séquestrées les drogues (Larsen et *al.*, 2000). Des études d'immunofluorescence réalisées sur des lignées cellulaires présentant un phénotype MDR ont montré l'implication de transporteurs ABC, tels que ABCA3 (Chapuy et *al.*, 2008), ABCB1 (Yamagishi et *al.*, 2013), ABCG2 (Iférgan et *al.*, 2005) et ABCC1 (Colombo et *al.*, 2014) dans l'internalisation des drogues.

Les principaux mécanismes de résistance abordés dans cette partie sont résumés dans la figure 2.





**Figure 2 : Les mécanismes de résistance à de multiples drogues des cellules cancéreuses.**  
D'après Gillet et Gottesman, 2012.

- 1) Concentration de l'anticancéreux insuffisante pour inhiber sa cible (SLCs et transporteurs ABC).
- 2) Métabolisation des drogues par des enzymes de détoxification.
- 3) Compartimentation des agents anticancéreux dans des organites cytoplasmiques.
- 4) Mécanismes de réparation de l'ADN.
- 5) Résistance à l'apoptose induite par les drogues.
- 6) Influence du micro environnement tumoral: Cellules stromales, myéloïdes et Hospicells.

## B. LA RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques constituent sans doute la découverte médicale la plus importante du 20<sup>ème</sup> siècle. Ils ont permis de faire reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses et de rallonger l'espérance de vie d'une vingtaine d'année. Mais leur utilisation excessive et parfois inappropriée, a conduit à l'émergence de souches bactériennes multi-résistantes (Levy et Marshall, 2004). A titre d'exemple, le taux de résistance des pneumocoques aux pénicillines est passé de 0,5 % en 1984 à 42 % en 2000. Chez les enfants, ce taux était même passé à 60 % en 2001. Cette progression constitue une vraie menace pour la santé publique. L'agence européenne du médicament estime que 25 000 personnes meurent chaque année en Europe de bactéries résistantes aux antibiotiques. La crainte d'un retour à l'ère « pré-antibiotiques » conduit aujourd'hui la communauté scientifique à une vraie réflexion sur leur usage (Barriere, 2014; Carlet J, 2014). En France, un plan national d'alerte sur les antibiotiques vient de fixer un objectif chiffré de réduction de consommation (-25 %) sur cinq ans<sup>2</sup>. Nous aborderons dans cette partie le mode d'action et les mécanismes de résistance des antibiotiques chez la bactérie.

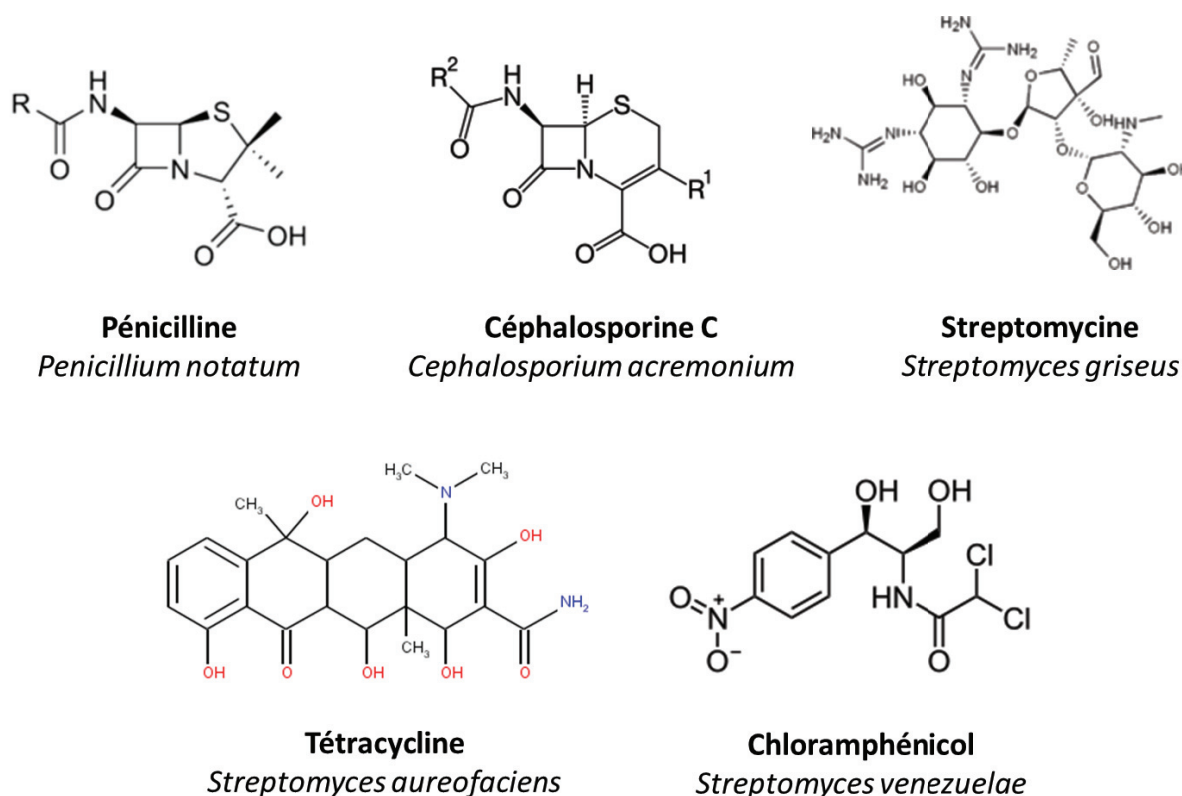
### Définition et découverte

Les antibiotiques sont des agents antimicrobiens, naturellement produits par des micro-organismes ou obtenus par semi-synthèse, qui se caractérisent par une toxicité sélective sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules eucaryotes. Ces molécules sont capables de tuer (action bactéricide) ou d'arrêter la croissance (action bactériostatique) des bactéries.

Le premier antibiotique fut découvert accidentellement en 1929 par Alexander Fleming. Après avoirensemencé des staphylocoques sur une boîte de pétri, il observa la présence de quelques colonies d'un champignon du genre *Penicillium*, responsables de l'inhibition de la croissance des bactéries. Il émit l'hypothèse que ce contaminant sécrétait une substance antibactérienne susceptible d'être utilisée en thérapeutique. Il montra par la suite que les extraits du *Penicillium* étaient bactéricides sans être toxiques pour les cellules

<sup>2</sup> Disponible sur le site: [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Plan\\_antibiotiques\\_2011-2016\\_.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Plan_antibiotiques_2011-2016_.pdf)

animales et donna le nom de pénicilline au principe actif de ces filtrats (Garrod, 1979). La découverte de Fleming fut reprise en 1939, par Florey et Chain, qui entreprirent d'extraire et de purifier la pénicilline à grande échelle en vue d'essais thérapeutiques. Les résultats furent spectaculaires, des maladies bactériennes mortelles comme la tuberculose ou la pneumonie contre lesquelles il n'existait aucun remède il y a 60 ans pouvaient désormais être traitées. En 1945, Fleming, Florey et Chain recevront le prix Nobel de physiologie-médecine pour « la découverte de la pénicilline et ses effets curatifs de nombreuses maladies infectieuses » (Raju 1999). Les principaux antibiotiques utilisés de nos jours furent alors découverts (figure 3): la pénicilline, la céphalosporine C (1953), la streptomycine (1944), la tétracycline (1955), le chloramphénicol (1947), etc. Depuis 1965, les antibiotiques semi-synthétiques ont vu le jour, en particulier les  $\beta$ -lactamines. Aujourd'hui, près de 10 000 molécules antibiotiques sont connues. La plupart sont des produits naturels, synthétisés par des procaryotes, des champignons, des végétaux supérieurs ou des animaux.

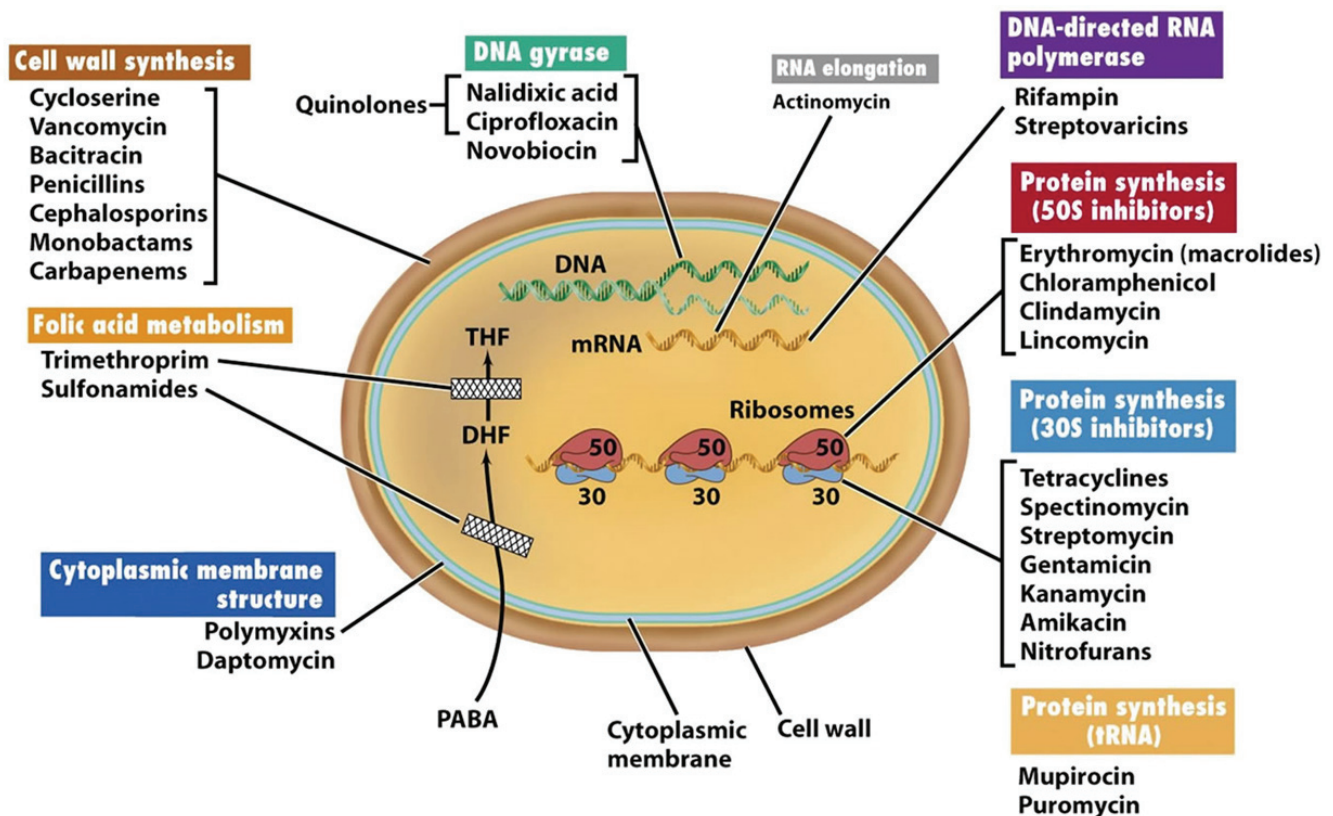


**Figure 3: Structure chimique de quelques antibiotiques produits par des micro-organismes.**

### Le mode d'action des antibiotiques

Le principe d'action des antibiotiques consiste à bloquer sélectivement une étape d'un mécanisme essentiel à la survie des micro-organismes. Le mécanisme ciblé doit être spécifique des bactéries et être absent chez les eucaryotes, afin de ne pas avoir d'impact sur les cellules du patient traité. Les antibiotiques peuvent être répartis en plusieurs familles,

suivant leur cible pharmacologique. Celles-ci sont illustrées dans la figure 4 et décrites ci-après.



**Figure 4: Les différentes classes d'antibiotiques et leur mécanisme d'action dans la bactérie.**

D'après Bbosa et al., 2014.

PABA: p-aminobenzoic acid; DHF A: dihydrofolate acid; THF A: tetrahydrofolic acid.

#### a) Action sur la paroi par inhibition de la synthèse du peptidoglycane

Les bactéries à gram positif sont protégées de l'environnement extérieur par une paroi. Celle-ci contient une couche de peptidoglycane, un polymère de sucres réticulé par des ponts de nature peptidique. Plusieurs antibiotiques agissent sur des enzymes intervenant dans la synthèse de cette paroi :

- ✚ Les  **$\beta$ -lactamines** (pénicillines, céphalosporines, monobactames, carbapénèmes) inhibent la transpeptidase intervenant dans la synthèse de la paroi.
- ✚ Les **glycopeptides** (vancomycine) se lient spécifiquement à la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane sur le dipeptide D-alanyl-D-alanine, masquant ainsi le site d'action des transpeptidases chargées de former les ponts peptidiques du peptidoglycane. Ils empêchent également la réaction de transglycosylation nécessaire à la synthèse du peptidoglycane.



- ✚ La fosfomycine se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe l'enzyme pyruvyl-transférase, ce qui bloque la formation d'acide N-acétylmuraminique, l'un des constituants essentiels du peptidoglycane.

### b) Action sur la membrane cytoplasmique

Les polymyxines sont des détergents cationiques qui interagissent avec les lipides membranaires et désorganisent la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram négatif. Ils permettent ainsi la perméabilité membranaire et la sortie des éléments hydrosolubles de la cellule.

### c) Inhibition de la synthèse protéique

Plusieurs antibiotiques agissent en interférant avec la synthèse protéique bactérienne. Les ribosomes de type 70S constituent une cible de choix car leur assemblage et leur taille sont différents de ceux des eucaryotes. Ils sont composés d'une grande sous-unité 50S et d'une petite sous-unité 30S. La sous-unité 50S comporte les ARN ribosomiaux (ARNr) 23S et 5S alors que la sous-unité 30S contient l'ARNr 16S. Les deux sous-unités sont la cible des antibiotiques :

- ✚ Les macrolides, la lincomycine et le chloramphénicol inhibent l'élongation de la chaîne peptidique en empêchant la fixation de la peptidyl transférase sur l'ARNr 23S de la sous-unité 50S.
- ✚ Les tétracyclines et les aminosides (kanamycine, streptomycine, gentamycine, amikacine) empêchent la liaison de l'amino-acyl-tRNA à l'ARNr 16S de la sous-unité 30S du ribosome bactérien.

### d) Inhibition de la synthèse des acides nucléiques

Les antibiotiques peuvent bloquer les voies de biosynthèse des acides nucléiques: La novobiocine, les quinolones (ciprofloxacine et acide nalidixique) et les fluoroquinolones ciblent l'ADN gyrase et les topoisomérases II et IV, empêchant la réplication de l'ADN bactérien. La rifampicine et l'actinomycine bloquent l'activité de l'ARN polymérase. Ces inhibiteurs doivent leur spécificité d'action aux différences qui existent entre les enzymes procaryotes et eucaryotes, permettant la reconnaissance de cibles sélectives.

### e) Inhibition du métabolisme des folates

Une voie métabolique fréquemment ciblée est celle de la synthèse des folates (vitamine B9). Ses dérivés, le dihydrofolate et le tétrahydrofolate interviennent dans des réactions de transfert de radicaux carbonés, essentielles à la synthèse de la thymine et par conséquent à celle de l'ADN. Les sulfamides sont des analogues structuraux de l'acide para-amino benzoïque (PABA), qui entrent en compétition avec celui-ci vis-à-vis de la dihydroptéroate synthétase et empêchent la synthèse des dihydrofolates (DHF). Le triméthoprime inhibe la dihydrofolate réductase bloquant la réduction des dihydrofolates en tétrahydrofolates.

## Les mécanismes de résistance chez la bactérie

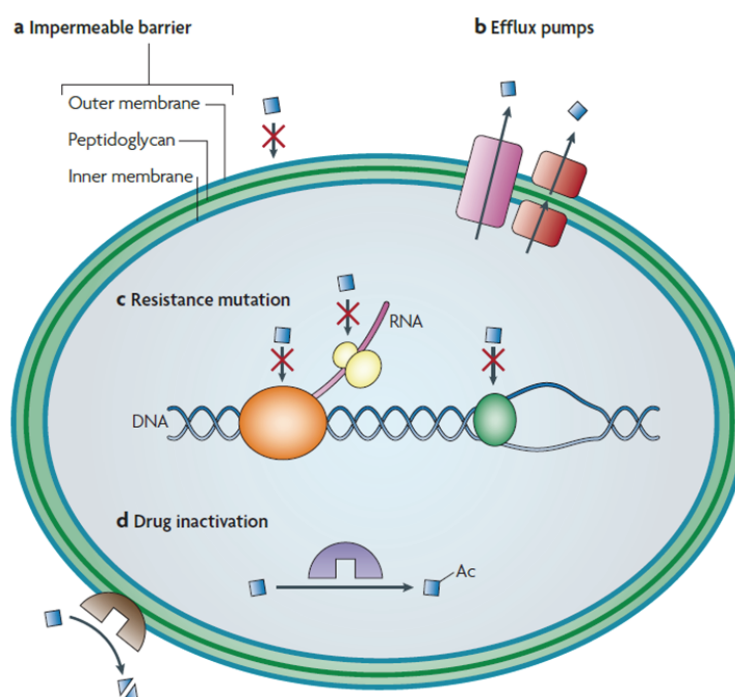
La résistance des bactéries aux antibiotiques résulte soit d'une résistance naturelle soit d'une résistance acquise. La résistance naturelle est stable et affecte toutes les bactéries de l'espèce considérée. C'est une propriété innée de la bactérie qui dépend de sa constitution génétique. L'entérobactérie *Klebsiella spp.* produit par exemple naturellement des  $\beta$ -lactamases, qui conduisent à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A (Bush 2010). Très préoccupante de nos jours, la résistance acquise est moins stable et ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée. Elle résulte d'une modification génétique de la bactérie, entraînant l'apparition subite d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques auxquels la bactérie est habituellement sensible.

### a) Les mécanismes génétiques

La bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques via une mutation génétique affectant le chromosome de la bactérie, ce qui permet à cette dernière de contourner l'effet délétère de l'antibiotique. La résistance chromosomique reste peu répandue (environ 20 %). La résistance peut également être liée à l'acquisition par conjugaison d'un plasmide ou d'un transposon, porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance. Cette résistance extra-chromosomique représente le mécanisme de résistance le plus répandu, soit 80 % des résistances acquises. Les résistances chromosomiques ne concernent en général qu'un antibiotique ou une famille d'antibiotiques alors que les résistances extra-chromosomiques peuvent quant à elles concerner plusieurs familles d'antibiotiques entraînant une polyrésistance.

### b) Les mécanismes biochimiques

La figure 5 ci-dessous illustre les quatre principaux mécanismes expliquant la résistance innée ou acquise des bactéries aux antibiotiques:



## Figure 5 : Les mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques chez la bactérie.

D'après Allen et *al.*, 2010.

### (1) Imperméabilisation de la membrane bactérienne

Chez les bactéries à Gram négatif, les porines de la membrane externe assurent l'entrée des antibiotiques hydrophiles dans l'espace périplasmique. Mais des mutations peuvent altérer la structure ou diminuer la synthèse des porines. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la résistance aux antibiotiques de la famille des carbapénèmes résulte de mutations affectant l'expression de la porine OprD (Ochs et *al.*, 1999).

### (2) Efflux actif de l'antibiotique

Une seconde stratégie de résistance est de rejeter hors de la cellule, l'antibiotique qui vient d'y entrer. Comme chez l'Homme, des pompes d'efflux contribuent à la multi-résistance aux antibiotiques MDR, en expulsant hors de la cellule des molécules de structure et composition chimique très différentes (Poole, 2004; Cattoir, 2004). Plus de 37 protéines d'efflux ont par exemple été répertoriées à ce jour chez *Escherichia coli* (Nishino et Yamaguchi, 2001). Nous décrirons les systèmes d'efflux bactériens responsables de ce phénomène dans la partie suivante.

### (3) Modification de la cible de l'antibiotique

Une mutation de la cible peut empêcher la reconnaissance de l'antibiotique. La résistance aux quinolones, qui agissent sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV impliquées dans la réplication de l'ADN, est par exemple due à des mutations conduisant à la production d'enzymes modifiées insensibles à ces antibiotiques (Drlica et Zhao, 1997). La résistance des staphylocoques à l'érythromycine est quant à elle causée par une mutation dans l'ARN ribosomal 23S, entraînant une diminution de l'affinité du site de fixation de l'antibiotique (Weisblum 1995).

### (4) Inactivation de l'antibiotique

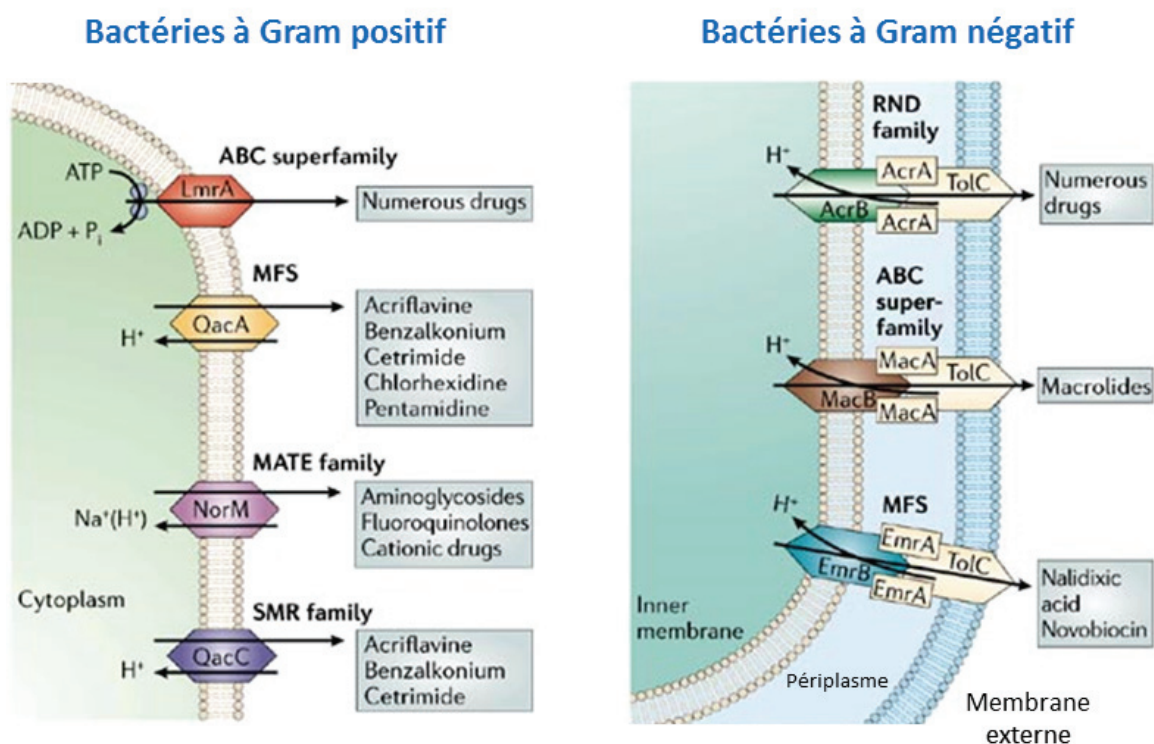
Des enzymes, synthétisées par la bactérie, peuvent inactiver l'antibiotique en le modifiant ou en l'hydrolysant. Il s'agit du mécanisme principal de résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines (famille de la pénicilline et de la céphalosporine). Les  $\beta$ -lactamases hydrolysent le cycle  $\beta$ -lactame des antibiotiques, désactivant ainsi les propriétés de la molécule.

## Les systèmes d'efflux bactériens

En 1978, les travaux de Levy sur la résistance aux tétracyclines mirent pour la première fois en évidence la capacité d'*Escherichia coli* à expulser des antibiotiques (Levy et McMurry, 1978). Les médicaments sont expulsés hors de la cellule par des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Leur rôle physiologique est de maintenir l'homéostasie cellulaire en important des nutriments, des aminoacides et des sucres ou en exportant les déchets endogènes, les substances néfastes telles que les métaux lourds et les molécules produites par la cellule (sels biliaires, acides gras, hormones etc.) (Piddock, 2006).

Elles sont également capables de prendre en charge des antibiotiques de structure et composition chimique très différentes et de les exporter hors de la cellule (phénotype MDR) (Pool, 2004). Ces transporteurs membranaires confèrent à la cellule un système de protection très efficace, universellement répandu chez les organismes vivants.

Les transporteurs utilisant l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons (familles **MFS** « Major Facilitator Superfamily », **RND** « Resistance Nodulation Division » et **SMR** « Small Multidrug Resistance ») ou d'ions sodium (famille **MATE** « Multidrug And Toxic compound Extrusion ») ou encore par hydrolyse d'ATP (famille **ABC**) constituent les cinq familles de pompes d'efflux MDR chez les procaryotes (figure 6) (Piddock, 2006). Chez les bactéries à Gram positif, les transporteurs ne sont constitués que d'une seule protéine, directement responsable de l'efflux vers le périplasma, à partir duquel les molécules diffusent vers l'extérieur via les porines (familles SMR/MATE/MFS/ABC). En revanche, chez les bactéries à Gram négatif, les transporteurs forment un complexe protéique ternaire, composé d'une protéine de la membrane interne, d'une protéine périplasmique de jonction appelée MFP (« Membrane Fusion Protein ») et d'une porine de la membrane externe OMF (« Outer Membrane Factor »), qui permet le transport des substrats à travers les deux membranes (familles ABC, RND, MFS). Pour la famille MFS, les deux types d'organisation peuvent être observés (Lomovskaya et Lewis, 1992).



**Figure 6 : Les familles de pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram positif et négatif.**

D'après Piddock, 2006.

Le membre le plus étudié de chaque famille de pompe d'efflux est indiqué ainsi que les substrats qu'il transporte.

### a) Les transporteurs MFS

Les protéines MFS sont ubiquitaires et présentes dans les trois règnes des organismes vivants. Ce sont des pompes de type symport ou antiport de 12 à 14 domaines transmembranaires, utilisant la force protomotrice, pour transporter une variété de substrats (sucres, intermédiaires du cycle de Krebs, esters phosphoriques, oligosaccharides et antibiotiques) (Law et al., 2008). Les principales pompes MDRs appartenant aux MFS et le substrat pour lequel ces protéines confèrent une résistance sont: NorA (quinolone chez *Staphylococcus aureus*) (Kaatz et al., 1991), QacA (antiseptiques chez *Staphylococcus aureus*) (Tennent et al., 1989), EmrB (drogues multiples chez *Escherichia coli*) (Lomovskaya et al., 1992) et TetE (tétracycline chez *Streptococcus pneumoniae*) (McMurry et al., 1980). En 2006, l'équipe de Geoffrey Chang a résolu la structure cristallographique du transporteur EmrD d'*Escherichia coli* (PDB: 2GFP, 3.5 Å), impliqué dans la résistance à de multiples drogues (acide nalidixique, cyanide m-chlorophenylhydrazone) (figure 7a) (Yin et al., 2006). Sa structure est composée de deux domaines de six hélices transmembranaires qui ont une organisation similaire. A leur interface, la cavité centrale, riche en résidus hydrophobes, constitue la voie de translocation des substrats. Au niveau du feuillet interne de la bicouche lipidique, deux longues boucles seraient impliquées dans la reconnaissance et la fixation des substrats.

### b) La famille SMR

Les protéines SMR sont composées de quatre domaines transmembranaires (environ 110 résidus) par monomère (Putman et al., 2000). Ce sont des antiports qui utilisent le gradient de protons comme source d'énergie. Deux pompes SMR sont particulièrement étudiées: QucC de *Staphylococcus aureus* et EmrE d'*Escherichia coli*, qui confèrent une résistance aux antiseptiques et aux désinfectants comme les ammoniums quaternaires (Li et Nikaido, 2004). La résolution des structures cristallographiques de EmrE en absence de substrat (PDB: 3B61, 4.5 Å) (figure 7c) et en complexe avec le tétraphénylphosphonium (PDB: 3B5D, 3.8 Å) montre que le transporteur s'organise sous forme homodimérique (Chen et al., 2007). Les deux monomères adoptent une orientation antiparallèle. Les trois premières hélices forment la voie de translocation des substrats alors que les quatrièmes participent à la formation du dimère (figure 7c).

### c) La famille RND

Les protéines de la famille RND sont des antiports dépendant du gradient de proton. Afin de transporter le substrat à travers le périplasme et la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ils forment un complexe d'efflux en s'associant avec une protéine de fusion membranaire et une protéine de la membrane externe. Le système AcrAB-TolC, composé de la protéine RND AcrB, de la porine TolC et de la protéine AcrA confèrent à *Escherichia coli* une résistance intrinsèque vis-à-vis de nombreux substrats tels que des antibiotiques ( $\beta$ -lactames, macrolides, chloramphénicol et fluoroquinolones), des acides gras, le bromure d'éthidium et des détergents comme le sodium dodécylsulfate (SDS) (Li et Nikaido, 2004). Les trois protéines de ce complexe ont été cristallisées : TolC (Koronakis et al., 2000; Higgins et al., 2004; Bavro et al., 2008; Pei et al., 2011), AcrA (Mikolosko et al., 2006), AcrB, seule

(Murakami et *al.*, 2002; Seeger et *al.*, 2006) et en présence de substrats tels que le déqualinium, la rhodamine 6G, l'éthidium et la ciprofloxacine (Yu et *al.*, 2003), le linézolide (Hung et *al.*, 2013), la doxorubicine, la minocycline (Murakami et *al.*, 2006; Eicher et *al.*, 2012), la rifampicine et l'érythromycine (Nakashima et *al.*, 2011), le désoxycholate (Drew et *al.*, 2008), la pénicilline (Yu et *al.*, 2005) et des inhibiteurs (Sennhauser et *al.*, 2007).

La première structure d'AcrB, résolue en 2002 par Murakami et ses collaborateurs, montre que le transporteur s'organise sous forme homotrimérique avec 12 hélices transmembranaires par monomère (figure 7e) (Murakami et *al.*, 2002). Il se compose d'un domaine membranaire et d'un domaine périplasmique, constitué d'une région permettant l'ancrage de TolC (« TolC docking domain ») et d'une région comportant un pore central (« porter domain »). Les trois monomères interagissent au niveau du « docking domain » via des boucles. En présence de substrat, la structure d'AcrB est asymétrique (Seeger et *al.*, 2006). Au cours du cycle de transport, un seul des trois monomères fixe le substrat et chacun adopte successivement trois conformations différentes, ce qui permet à AcrB de fonctionner comme une pompe péristaltique (figure 8) : un état « loose » dans lequel un monomère lie le substrat au niveau de son domaine périplasmique; un changement de conformation permet à la drogue d'atteindre le domaine « porter » (état « tight »); une dernière transition conformationnelle permet la libération du substrat dans le canal d'AcrB afin de rejoindre TolC (état « open »). Ce mécanisme d'efflux a été validé par des expériences de réticulation covalente entre cystéine menées sur plusieurs domaines d'AcrB (Seeger et *al.*, 2008). Du et ses collaborateurs ont récemment proposé un modèle pour l'assemblage du complexe AcrA-AcrB-TolC (Du et *al.*, 2014).

#### d) La famille MATE

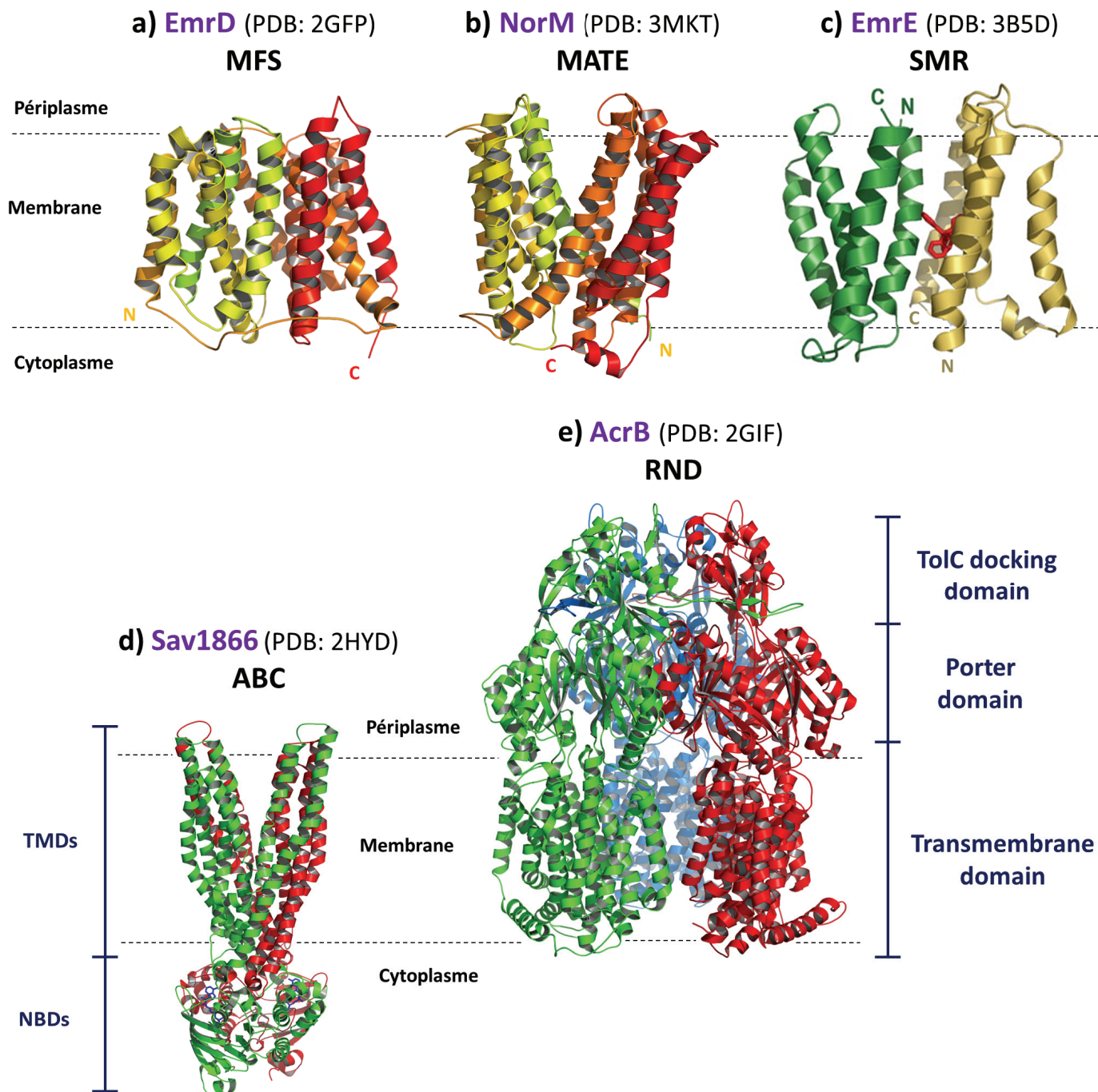
Les transporteurs MATE ont une topologie similaire à celle des protéines MFS avec 12 à 14 domaines transmembranaires (Brown et *al.*, 1999), mais l'énergie nécessaire pour l'efflux est apportée par un gradient de sodium. NorM de *Vibrio parahaemolyticus* fut le premier transporteur de la famille MATE à avoir été identifié (Morita et *al.*, 1998). Il confère la résistance à la norfloxacine, au bromure d'éthidium, et à certains aminoglycosides (streptomycine et kanamycine). Les structures de NorM, résolues en absence (He et *al.*, 2010) (figure 7b) et en présence de substrats (Lu et *al.*, 2013), révèlent la présence de deux domaines de six hélices transmembranaires qui forment une cavité en forme de V, ouverte vers l'extérieur de la cellule (figure 7b).

#### e) Les transporteurs ABC

Les transporteurs utilisant l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons ou d'ions sodium ont longtemps été considérés comme les seuls responsables du phénotype MDR chez les bactéries, mais en 1996, Konings et Van Veen découvrirent qu'un transporteur de type ABC, LmrA, confère un phénotype MDR chez *Lactococcus lactis* (Van Veen et *al.*, 1996). Le séquençage de génomes bactériens a ensuite permis de décrire d'autres transporteurs ABC capables de transporter des antibiotiques: DrrAB de *Streptomyces peucetius* (Kaur, 1997 ; Kaur et Russell, 1998), Sav1866 de *Staphylococcus aureus* (figure 7d) (Dawson et Locher, 2006), HlyB de *Escherichia coli*, HisQMP<sub>2</sub>/MalFGK<sub>2</sub>/OppF de *Salmonella thyphimurium*

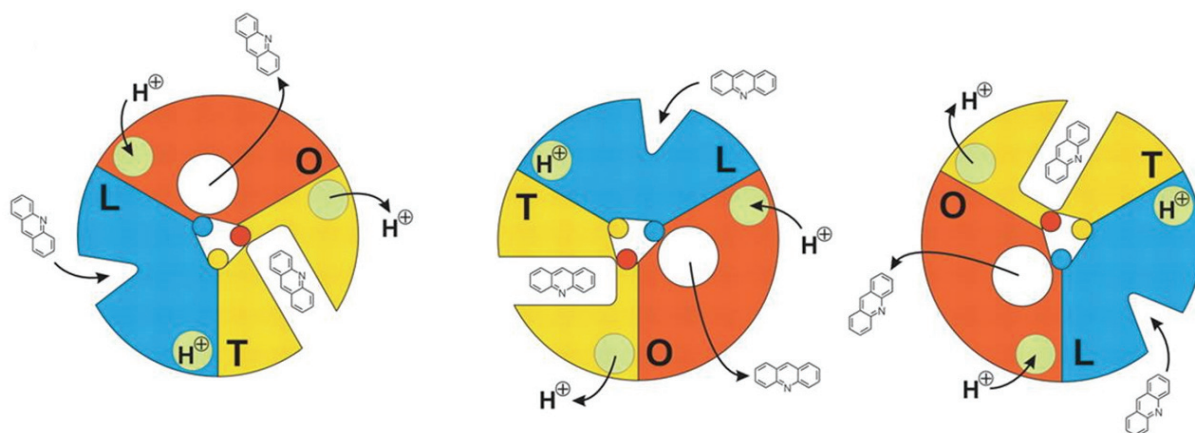


ou encore BmrA de *Bacillus subtilis* (Steinfels et *al.*, 2004). Certains d'entre eux (Sav1866, BmrA) sont des homologues fonctionnels et structuraux des transporteurs ABC humains impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses, que nous avons mentionnés précédemment (P-gp, MRP1, BCRP). Nous reviendrons plus en détails sur cette famille de transporteurs dans la partie suivante.



**Figure 7 : La Structure cristallographique d'un transporteur de chaque système d'efflux MDR.**

**(a)** EmrD d'*Escherichia coli*. **(b)** NorM de *Vibrio cholerae* **(c)** EmrE d'*Escherichia coli* **(d)** Sav1866 de *Staphylococcus aureus* **(e)** AcrB d'*Escherichia coli*.



**Figure 8 : Le mécanisme d'efflux rotatif d'ArcB.**

D'après Seeger et *al.*, 2006.

La conformation « loose » (L) est coloriée en bleu, la conformation « tight » en jaune et la conformation « open » en orange.



## II. LES TRANSPORTEURS ABC

### A. GENERALITES

En 1973, Dano montra pour la première fois que la résistance aux anticancéreux est due à un transport actif des agents chimiothérapeutiques hors des cellules tumorales (Dano 1973). Le premier transporteur décrit fut la P-glycoprotéine en 1976 par Juliano et Ling. Le nom de « transporteur ABC » fut ensuite introduit en 1986 par Higgins en se basant sur la présence d'un domaine hautement conservé appelé « ATP-Binding Cassette » (Higgins et *al.*, 1986). On dénombre aujourd'hui plus de 3000 gènes de la bactérie à l'homme codant pour ces pompes. Il en existe 48 chez l'homme (Dean et *al.*, 2001), 28 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Bauer et *al.*, 1999), 78 chez *Bacillus subtilis* (Quentin et *al.*, 1999), plus de 150 chez les plantes (Kang et *al.*, 2011) et 80 chez *Escherichia coli* représentant 5% de son génome (Blattner et *al.*, 1997). Ces protéines membranaires utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour exporter ou importer de manière unidirectionnelle une grande variété de substrats à travers la membrane de la cellule ou des organites (mitochondrie, peroxysome, réticulum endoplasmique et appareil de golgi) (Saurin et *al.*, 1999) : ions (CFTR chez l'homme), métaux lourds (HMT1 de *Saccharomyces cerevisiae*), sucres (MalFGK<sub>2</sub> d'*Escherichia coli*), acides aminés (HisQMP<sub>2</sub> de *Salmonella typhimurium*), peptides (TAP chez l'homme), protéines (Hlyb d'*E. coli*), lipides (MsbA d'*E. coli*), stéroïdes (Pdr5 de *S. cerevisiae*), vitamines (BtuCD d'*E. coli*), anticancéreux (P-gp chez l'homme), antibiotiques (LmrA de *Bacillus subtilis*), anti-infectieux (Pfmdr de *Plasmodium falciparum*), et antifongiques (CDR1 de *Candida albicans*).

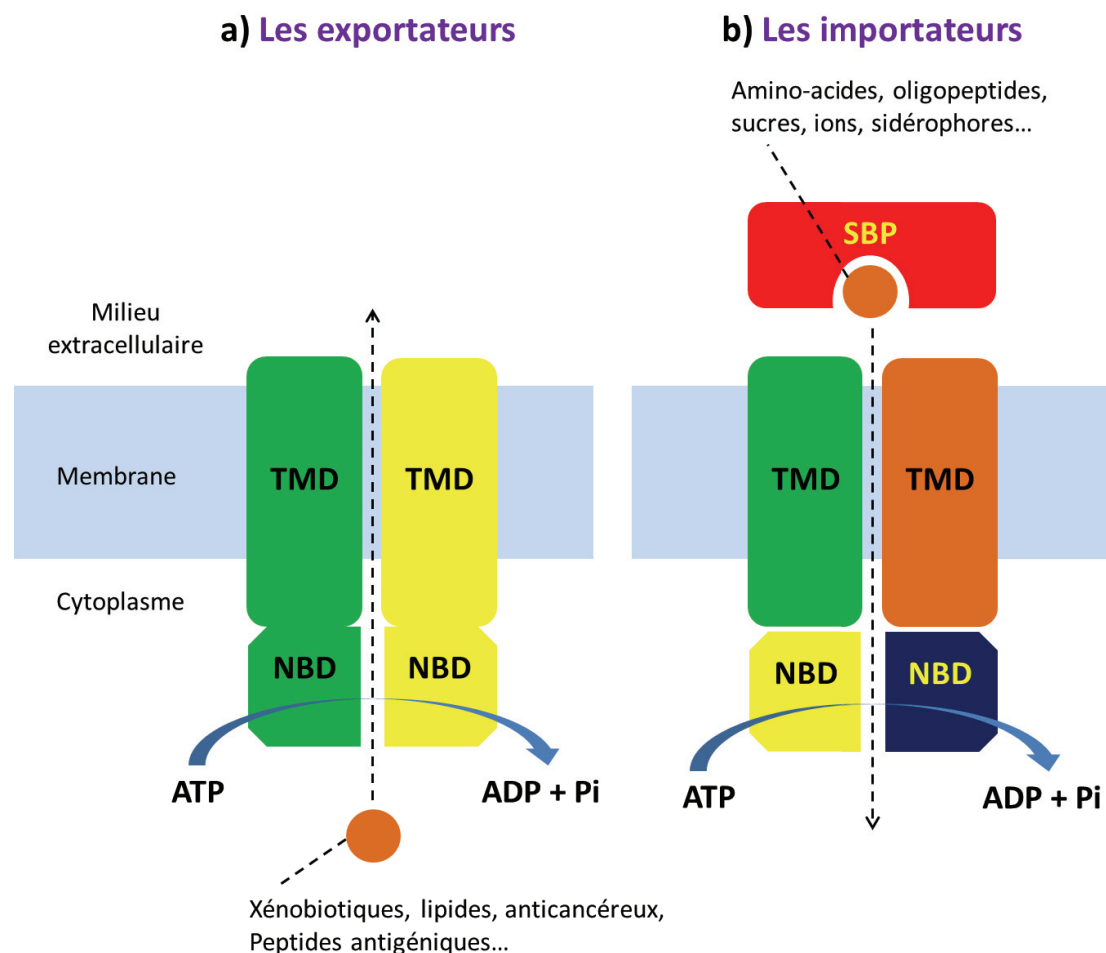
### B. UNE TOPOLOGIE COMMUNE

En dépit de la grande diversité de leurs substrats, les transporteurs ABC possèdent une organisation structurale très conservée, composée de quatre domaines (Schneider et Hunke, 1998) :

- ⊕ deux domaines transmembranaires appelés **TMD** (« **TransMembrane Domain** ») qui interviennent dans la reconnaissance et le transport des substrats.
- ⊕ deux domaines cytoplasmiques appelés **NBD** (« **Nucleotide-Binding Domain** ») qui fixent et hydrolysent l'ATP.

Chez les importateurs, les NBDs et les TMDs sont synthétisés sous forme de chaînes polypeptidiques distinctes (figure 9b) alors que chez les exportateurs procaryotes, un NBD est fusionné à un TMD générant un « demi-transporteur », qui s'organise ensuite sous forme homo- ou hétéro-dimérique pour former un transporteur ABC fonctionnel (Higgins 1992) (figure 9a). Les importateurs, également appelés BPD (« **B**inding **P**rotein-**D**ependent »), sont présents uniquement chez les procaryotes (Rees et *al.*, 2009). Une récente étude a toutefois montré qu'ABCA4, un transporteur ABC eucaryote fonctionne comme un importateur (Quazi et *al.*, 2012). Ils dépendent d'une protéine extracellulaire qui lie le substrat à l'extérieur de la cellule et l'achemine vers les TMDs (Quiocho et Ledvina 1996). Cette protéine, nommée SBP

(« **Substrate-Binding Protein** ») peut être fusionnée au TMD, liée à la membrane par un peptide transmembranaire ou par un lipide d'ancrage ou encore être libre dans le périplasma (comme MalE pour le transpoteur de maltose MalFGK<sub>2</sub>) (van der Heide et Poolman 2002). Les exportateurs sont quant à eux présents chez les procaryotes et les eucaryotes. Leurs domaines transmembranaires et cytoplasmiques peuvent appartenir à la même chaîne polypeptidique comme c'est le cas pour les transporteurs eucaryotes (glycoprotéine-P, MRP1 et CFTR) (Saurin et *al.*, 1999). On les qualifie de transporteurs entiers. Ils peuvent aussi être synthétisés séparément, sous forme de deux, trois ou quatre polypeptides, comme chez les procaryotes. Les transporteurs ABC bactériens LmrA de *Lactococcus lactis* et BmrA de *Bacillus subtilis* s'organisent par exemple sous forme homodimérique, où chaque monomère correspond à la fusion d'un domaine NBD et d'un domaine TMD.



**Figure 9: La topologie commune des transporteurs ABC.**

Représentations schématique **(a)** des exportateurs ABC **(b)** des importateurs ABC.

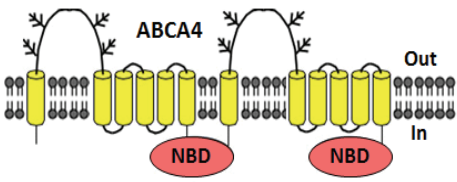
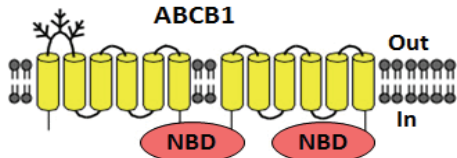
## C. CLASSIFICATION

Les transporteurs ABC possèdent des motifs communs et des séquences homologues, suggérant une origine commune. Afin de comprendre la complexité et la diversité de la superfamille des ABC, Dassa et Bouige menèrent en 2001 une étude phylogénétique par ali-

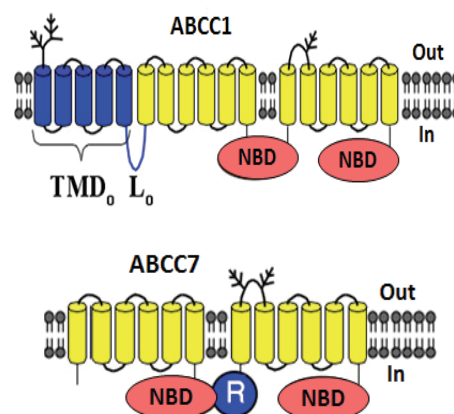
gnement de séquences *in silico* des 600 protéines ABC répertoriées. Ce travail a permis de ranger les transporteurs ABC en trois classes majeures (Dassa et Bouige, 2001) :

- ⊕ **La classe 1** comprend les exportateurs procaryotes et eucaryotes dans lesquels les TMDs et les NBDs sont fusionnés.
- ⊕ **La classe 2** regroupe les protéines dépourvues de TMDs mais possédant un domaine ABC, elles ne sont pas impliquées dans le transport mais dans diverses fonctions cellulaires telles que la réparation de l'ADN (Rad50), la traduction (EF3), ou des fonctions de régulation (ABCE1, GCN20) (Hopfner et Tainer, 2003).
- ⊕ **La classe 3** comprend tous les importateurs BDP dans lesquels les TMDs et les NBDs sont portés par des chaînes polypeptidiques indépendantes, mais également d'autres systèmes moins caractérisés.

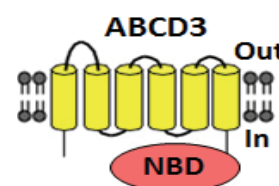
Chez l'homme, une classification des 48 transporteurs ABC a été effectuée en fonction de leur topologie, leur homologie de séquences et d'analyses phylogénétiques (Dean et al., 2001 ; Klein et al., 1999). Sept sous familles ont ainsi été identifiées et classées selon la nomenclature HUGO (« **HU**man **G**enome **O**rganisation », <http://www.genenames.org>), allant de ABCA à ABCG suivi d'un numéro correspondant à chaque transporteur. Le tableau 1 indique entre parenthèses le nombre de transporteurs ABC associé à chaque sous-famille ainsi que la topologie de l'un de ses membres.

Sous-familles ABC	Topologie
<p>⊕ <b>La sous-famille A</b> (13) comprend treize transporteurs entiers. Elle contient certaines des protéines ABC les plus grandes (jusqu'à plus de 2100 aminoacides). ABCA1, impliqué dans le transport du cholestérol et ABCA4 qui transporte des dérivés de la vitamine A sont les deux membres les plus étudiés.</p>	
<p>⊕ <b>La sous-famille B</b> (11) comprend quatre transporteurs entiers (B1, B4, B5 et B11) et sept demi-transporteurs (B2, B3, B6-B10). ABCB1 (ou P-gp) est le premier transporteur ABC à avoir été découvert, cloné et étudié chez l'Homme de par son implication dans le phénotype MDR des cellules cancéreuses. D'autres membres de la sous-famille B (B4, B5 et B11) sont aussi impliqués dans la résistance aux médicaments.</p>	

- ⊕ **La sous-famille C** (13) comprend douze transporteurs entiers impliqués dans des fonctions différentes comme le transport des ions et la sécrétion des toxines. Ils peuvent parfois être de simples récepteurs de surface. ABCC7 (ou CFTR) impliqué dans la mucoviscidose et ABCC1 (ou MRP1), impliqué dans le phénotype MDR, en sont deux membres très largement étudiés.



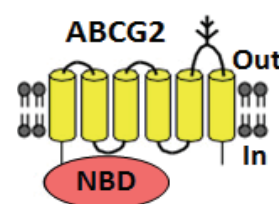
- ⊕ **La sous-famille D** (4) comporte quatre demi-transporteurs présents uniquement dans le peroxysoxe où ils fonctionnent comme homo- ou hétéro-dimères pour transporter les acides gras à très longue chaîne.



- ⊕ **Les sous-familles E (1) et F (3)** appartiennent à la classe 2 des transporteurs ABC car ils ne possèdent pas de TMDs et ne semblent pas impliqués dans le transport de substrats. ABCE1 est l'unique membre de la sous-famille E, il est impliqué dans la reconnaissance de l'oligoadénylate synthase, produite en réponse à l'infection par des virus. Les trois membres de la sous-famille F jouent un rôle dans le processus inflammatoire.



- ⊕ **La sous-famille G** (5) comprend six demi-transporteurs inversés (les NBDs sont localisés du côté N-terminal et les TMDs du côté C-terminal). Les membres de cette sous-famille fonctionnent comme des homo-dimères (G1, G2 et G4) ou des hétéro-dimères (G5 et G8). ABCG2 est le transporteur le plus étudié de cette sous-famille. Il est aujourd'hui considéré avec P-gp et MRP1 comme l'un des transporteurs majeurs responsables du phénotype MDR.



**Tableau 1 : Classification des transporteurs ABC humains.**

Adapté de Loo et Clarke, 2008.

Le nombre de transporteurs ABC de chaque sous-famille est indiqué entre parenthèses. La topologie d'un membre de chaque sous-famille est représentée. Les cylindres jaunes représentent les segments transmembranaires dans les TMDs. Les domaines

supplémentaires (R, TMD<sub>0</sub>) sont colorés en bleu.

Les transporteurs ABC humains présentent une variabilité dans la façon dont les quatre domaines transmembranaires et cytoplasmiques sont organisés. ABCG2 a la particularité d'avoir une structure inversée avec les NBDs positionnés du côté N-terminal contrairement à P-gp ou MRP1 (Sarkadi et *al.*, 2006). Les transporteurs de la famille ABCC (hormis ABCC4/MRP4, ABCC5/MRP5, ABCC7/CFTR, ABCC11/MRP8, ABCC12/MRP9 et ABCC13) possèdent du côté N-terminal un TMD supplémentaire constitué de cinq hélices  $\alpha$  transmembranaires (TMD<sub>0</sub>) qui n'est pas indispensable pour la fonction de transport (tableau 1) (Bakos et *al.*, 2000). Tap1/Tap2 (« Transporter associated with Antigen Processing »), un transporteur ABC de peptides cytoplasmiques, possède aussi du côté N-terminal des hélices transmembranaires supplémentaires, essentielles pour l'interaction avec la tapasine (Procko et *al.*, 2005). CFTR présente une topologie identique à P-gp mis à part le fait qu'il possède après le premier NBD un domaine régulateur cytoplasmique R. L'ouverture du canal CFTR est contrôlée par la phosphorylation de ce domaine (Cheng et *al.*, 1991). Chaque transporteur possède également un nombre variable de glycosylations sur les boucles extracellulaires.

#### D. IMPLICATION DANS LES PATHOLOGIES HUMAINES

Les transporteurs ABC ont des rôles physiologiques primordiaux pour le fonctionnement de l'organisme. Ils sont exprimés au niveau d'importantes barrières tissulaires, telles que la muqueuse intestinale et l'endothélium qui constitue la barrière hémato-encéphalique, mais aussi d'épithélium d'élimination, comme les membranes apicales du canal biliaire des hépatocytes et du tubule rénal (Szakacs et *al.*, 2006). Une mutation génétique peut par conséquent engendrer un dérèglement fonctionnel entraînant une pathologie. Le tableau 2 énumère les maladies génétiques dans lesquelles une ou plusieurs mutations dans les gènes codant des transporteurs ABC humains sont impliquées :

Transporteur ABC	HUGO	Maladie associée	Référence
<b>ABC1</b>	ABCA1	Maladie de Tangier	Rust 1999
<b>ABCR</b>	ABCA4	Maladie de Stargardt	Allikmets 1997
<b>MDR1/P-gp</b>	ABCB1	Résistance des cancers à la chimiothérapie	Chen 1986
<b>TAP1/TAP 2</b>	ABCB2/ABCB3	Immunodéficiences	de la Salle 1999
<b>MDR3</b>	ABCB4	Cholestase familiale de type 3	de Vree 1998
<b>ABC7</b>	ABCB7	Sidéroblastose liée au chromosome X	Allikmets 1999
<b>SPGP</b>	ABCB11	Cholestase familiale de type 2	Strautnieks
<b>MRP1</b>	ABCC1	Résistance des cancers à la chimiothérapie	Cole 1992
<b>MRP2</b>	ABCC2	Syndrome de Dubin-Johnson	Paulusma 1996
<b>MRP6</b>	ABCC6	Pseudoxanthome élastique	Ringpfeil 2000

<b>CFTR</b>	<b>ABCC7</b>	<b>Mucoviscidose</b>	<b>Riordan 1989</b>
<b>SUR1/SUR2</b>	<b>ABCC8/ABCC9</b>	<b>Hyperinsulinisme familial</b>	<b>Thomas 1995</b>
<b>ALDP</b>	<b>ABCD1</b>	<b>Adrénoleucodystrophie</b>	<b>Watkins 1995</b>
<b>PMP70</b>	<b>ABCD3</b>	<b>Syndrome de Zellweger</b>	<b>Gartner 1992</b>
<b>BCRP</b>	<b>ABCG2</b>	<b>Résistance des cancers à la chimiothérapie</b>	<b>Doyle 1998</b>
<b>White 3</b>	<b>ABCG5</b>	<b>Sitostérolémie</b>	<b>Berge 2000</b>

**Tableau 2: Transporteurs ABC impliqués dans des pathologies humaines.**

Adapté de Gottesman et Ambudkar, 2001.

La maladie génétique la plus connue est sous aucun doute la mucoviscidose, induite par une mutation dans le gène *Abcc7* codant pour CFTR (« Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator »). Plus de cents mutations différentes ont été découvertes, cependant dans 70 % des cas de maladie, c'est la délétion de la phénylalanine 508 qui est impliquée (Riordan, 2005). Cette mutation empêche l'adressage du canal chlorure CFTR à la surface des cellules épithéliales, avec pour principale conséquence une anomalie du transport des ions chlorure à travers les épithéliums. La traduction clinique de cette maladie est une obstruction pulmonaire chronique due à l'accumulation de mucus dans les bronches, entraînant infections pulmonaires et insuffisance respiratoire.

La chimiorésistance des cancers, cause d'échec des chimiothérapies, est en général causée par la surexpression des transporteurs ABC qui sont capables d'exporter des molécules cytotoxiques et de conférer à la cellule tumorale une résistance à de nombreux agents anticancéreux (doxorubicine, vinblastine, étoposide, taxol). La surexpression d'au moins douze transporteurs ABC a été démontrée *in vitro*, comme étant impliquée dans la résistance des cellules aux médicaments (Szakacs et al., 2006). L'implication clinique des transporteurs ABC n'a été démontrée que pour trois de ces transporteurs : la glycoprotéine-P, MRP1 et BCRP.

## **E. DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES SUR LES TRANSPORTEURS ABC**

### **Les domaines de fixation des nucléotides (NBDs)**

#### **a) La structure commune des domaines NBDs**

A la différence des TMDs, les domaines nucléotidiques sont hydrophiles, homologues et communs à tous les transporteurs ABC. La première structure d'un NBD publiée fut celle de l'importateur d'histidine HisP de *Salmonella typhimurium*, avec une résolution de 1.5 Å et cristallisée avec une molécule d'ATP (Hung et al., 1998). Cette structure a permis de mieux comprendre l'organisation et le fonctionnement des NBDs.

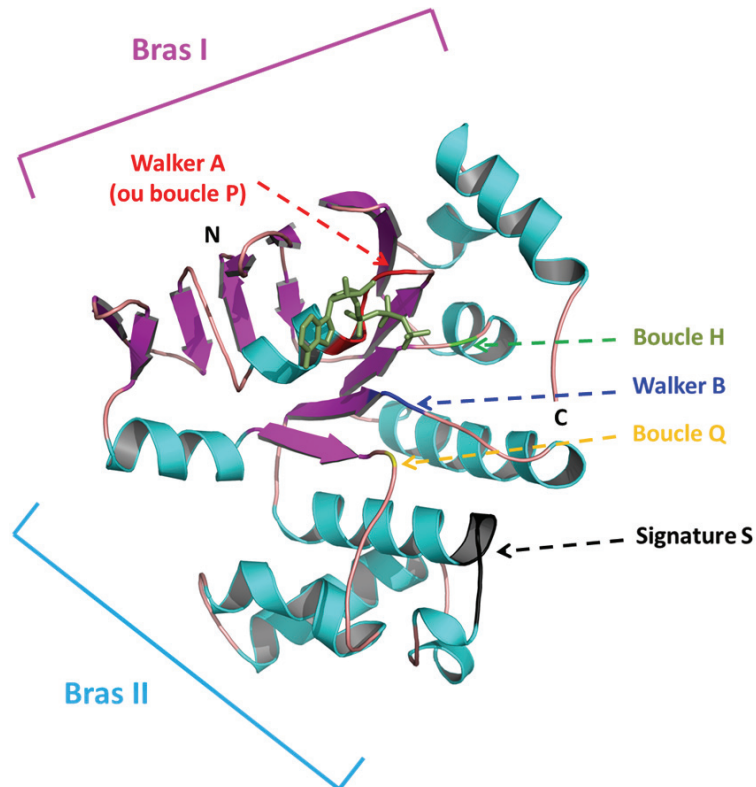
Le domaine nucléotidique de HisP s'organise en forme de « L » avec deux bras (ou lobes) I et II orientés perpendiculairement (figure 10). Le bras I, composé d'hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ) et de feuillets  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 4$ - $\beta 7$ ) correspond à la poche de fixation de l'ATP avec no-

tamment les motifs A et B de Walker (Walker et *al.*, 1982). Les résidus du **motif Walker A** (GXXGXGKS/T), appelé aussi « P-loop », interagissent avec la chaîne phosphate de l'ATP (Chen et *al.*, 2003; Karpowich et *al.*, 2001). Le résidu aspartate du **Walker B** forme une liaison de coordination avec l'ion  $Mg^{2+}$ , essentiel à l'hydrolyse de l'ATP (Smith et *al.*, 2002). Ce résidu est immédiatement suivi par un glutamate reconnu comme catalytique de l'hydrolyse d'ATP (Orelle et *al.*, 2003).

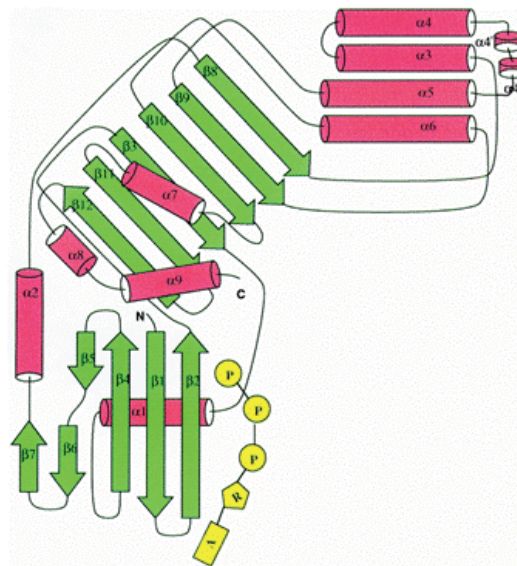
Le bras II, composé entièrement d'hélices  $\alpha$  ( $\alpha 3$ - $\alpha 9$ ), contient la **signature S** ou **motif C** (Gottesman et *al.*, 1995) de séquence consensus LSGGQ (Higgins et *al.*, 1986), spécifique de la superfamille ABC. Ce motif est le seul à ne pas entrer en contact avec l'ATP dans la structure monomérique de HisP. Les structures dimériques de Malk (Chen et *al.*, 2003) et MJ0796 (Smith et *al.*, 2002) ont permis de mieux comprendre le rôle fonctionnel de ce motif. Dans les deux cas, le motif signature interagit avec l'ATP lorsque les NBDs sont sous forme dimérique en position fermée (en complexe avec deux molécules d'ATP). Une mutation au niveau de ce motif bloque l'activité d'hydrolyse de l'ATP des transporteurs ABC (Higgins et Linton, 2004). Les motifs Walker A et B d'un NBD s'associent avec le motif C du NBD opposé pour former le site de fixation des nucléotides. La signature S jouerait ainsi le rôle de détecteur du phosphate  $\gamma$  dans le NBD opposé au sein du dimère (Hopfner et *al.*, 2000). Enfin, les six feuillets  $\beta$  ( $\beta 3$ ,  $\beta 8$ - $\beta 12$ ) séparant les deux bras contiennent **les boucles Q et H** (Q-loop, H-loop). Le résidu histidine de la boucle H stabilise la fixation des nucléotides en formant une liaison hydrogène avec le phosphate  $\gamma$  de l'ATP (Chen et *al.*, 2003). Le résidu glutamine de la boucle Q permet la transmission des changements de conformation des NBDs aux TMDs (Jones et George, 2002).



a)



b)



**Figure 10 : Structure cristallographique du domaine NBD de l'histidine perméase (PDB :1B0U, 1.5 Å).**

D'après Hung et *al.*, 1998.

**a)** Les hélices  $\alpha$  sont colorées en bleu ciel et les feuillets  $\beta$  en magenta. Les motifs consensus sont indiqués (en rouge, le Walker A; en bleu, le Walker B; en noir, la signature S; en vert, la boucle H et en jaune, la boucle Q). Le bras I est composé de feuillets  $\beta$  et comprend les motifs A et B de Walker. Le bras II est constitué d'hélices  $\alpha$  et contient la signature S. Les extrémités N- et C- terminales sont indiquées en lettres majuscules noires. La molécule d'ATP est représentée en « stick » de couleur verte **b)** Organisation des différentes hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  constituant le NBD de HisP.

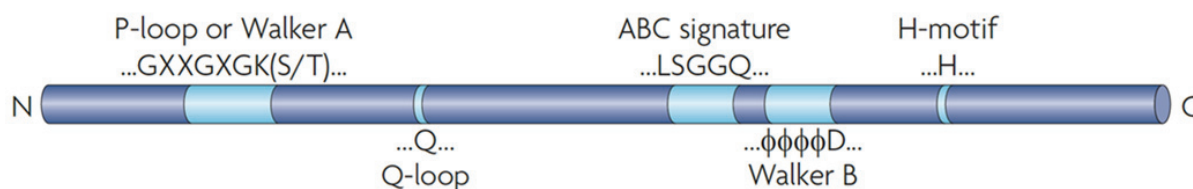


L'ensemble des motifs conservés et résidus impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP sont récapitulés dans le tableau 3 ci-dessous.

Motifs	Séquence consensus	Rôle
<b>Walker A (ou boucle P)</b>	<b>GXXGXGKS/T</b> (où X est un résidu variable)	La lysine conservée interagit avec les phosphates $\beta$ et $\gamma$ de l'ATP.
<b>Walker B</b>	<b>hhhhDE</b> (où h est un résidu hydrophobe)	Le résidu aspartate forme une liaison de coordination avec le $Mg^{2+}$ essentiel à l'hydrolyse de l'ATP. Il est suivi par un glutamate qui agit comme une base catalytique pour déprotoner une molécule d'eau.
<b>Signature S</b>	<b>LSSGQ</b>	Interagit avec le phosphate $\gamma$ de l'ATP.
<b>Région Switch (ou Boucle H)</b>	Résidu <b>histidine</b> conservé	L'histidine Interagit avec le résidu aspartate de la boucle D, le phosphate $\gamma$ de l'ATP et le glutamate du Walker B (dans le modèle proposé de catalyse assistée par le substrat).
<b>Boucle D</b>	<b>SALD</b>	Impliquée dans l'interaction entre les deux NBDs dans l'état de liaison à l'ATP/ $Mg^{2+}$ . Interagit avec la molécule d'eau catalytique par une liaison hydrogène.
<b>Boucle Q</b>	Résidu <b>glutamine</b> conservé	Fait la connexion entre le domaine catalytique (bras I) et le domaine de signalisation (bras II). Intervient dans la communication entre le NBD et le TMD via des changements conformationnels. La glutamine établit une liaison de coordination avec l'ion $Mg^{2+}$ et interagit avec le phosphate $\gamma$ de l'ATP.
<b>Boucle A</b>	Résidu <b>aromatique</b> conservé (généralement une tyrosine)	Contribue à positionner l'ATP dans le site catalytique via les interactions entre les noyaux aromatiques du résidu tyrosine et de l'ATP.
<b>Boucle X (X-loop)</b>	<b>TXVGEXG</b> (où X est un résidu variable)	Répond à la fixation et à l'hydrolyse de l'ATP et transmet les changements conformationnels via des boucles intracellulaires

**Tableau 3. Séquences et fonctions des différents motifs conservés des NBDs.**

L'ordre dans lequel apparaissent les motifs conservés le long de la chaîne peptidique est illustré de façon simplifiée dans la figure 11. A partir de l'extrémité N terminale du NBD, le motif Walker A est rencontré en premier. La boucle Q assure ensuite la connexion entre le domaine catalytique (bras I) et le domaine de signalisation (bras II). Ce dernier contient la signature ABC où une quinzaine de résidus après se trouve une région comportant une proline fortement conservée appelée Pro-loop (Oswald et *al.*, 2006). Cette boucle assure le retour vers le domaine catalytique qui comporte le motif Walker B suivi des boucles D et H.



**Figure 11 : Position des motifs conservés le long de la chaîne polypeptidique.**

#### **b) Les structures cristallographiques de domaines NBDs**

Les NBDs étant des domaines hydrophiles et solubles, ils sont plus facilement cristallisables que les transporteurs complets. Depuis HisP, soixante-seize autres structures de NBD de différentes espèces ont été résolues, seul, en présence d'ATP ou d'AMPPNP (un analogue non hydrolysable de l'ATP). Toutes les structures de NBD complexées à l'ATP ont été obtenues soit avec des mutations au niveau des résidus catalytiques du site actif soit en absence de magnésium afin d'arrêter la réaction d'hydrolyse de l'ATP et stabiliser une conformation en vue du processus de cristallisation. Les détails concernant l'origine, la fonction, le code PDB et la résolution de ces structures sont résumés dans le tableau 4 ci-dessous :

	Nom	Organisme	Substrat ou fonction	Code PDB	Résolution Å, (ligand ou conformation)	Ref.
Importateurs ABC	HisP	<i>S. typhimurium</i>	Histidine	1B0U	1.5 (ATP)	Hung 1998
		<i>T. litoralis</i>	Maltose	1G29	1.9 (PPi)	Diederichs 2000
	MalK	<i>E. coli</i>	Maltose	1Q1E	2.9 (Apo ouverte)	Chen 2003
				1Q1B	2.8 (Apo semi-ouverte)	
				1Q12	2.6 (ATP fermé)	
				2AWO	2.8 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	Lu 2005
				2AWN	2.3 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	
		<i>P. horikoshii</i>	Maltose	1V43 1VCI	2.2 (Apo ouverte) 2.9 (ATP)	Ose 2004
	BtuCD	<i>E. coli</i>	Vitamine B12	1L7V	3.2 (cyclovanadate)	Locher 2002
	GlcV	<i>S. solfataricus</i>	Glucose	1OXS	1.65 (Apo)	Verdon 2003
				1OXT	2.1 (Apo)	
				1OXU	2.1 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	
				1OXV	1.95 (AMPPNP-Mg <sup>2+</sup> )	
				1OXX	1.45 (I)	
	CysA	<i>A. acidocaldarius</i>	Sulfate/ thiosulfate	1Z47	2.0 (Apo)	Scheffell 2005
	Dpp	<i>T. tengcongensis</i>	Dipeptides	4FWI	2.89 (ATP-Mg <sup>2+</sup> /Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> )	Li 2013
	FbpC	<i>N. gonorrhoeae</i>	Fe <sup>3+</sup>	3FVQ	1.9 (ATP)	Newstead 2009
	ArtP	<i>g. stearothermophilus</i>	Aminoacides chargés posi- tivement	3C41	2.25 (AMPPNP-Mg <sup>2+</sup> )	Thaben 2014
				2OLJ	2.05 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	
				2OLK	2.1 (ADP-β-S)	
				3C4J	2.3 (ATP-γ-S)	
				2OUK	2.15 (SO <sub>4</sub> )	
				2Q0H	2.2 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	
	HlyB (E631Q)	<i>E. coli</i>	Hémolysine	2FFB 2FGK	1.9 (ADP) 2.7 (ATP)	Zaitseva 2006
	HlyB	<i>E. coli</i>	Hémolysine	2FF7 1MT0	1.6 (ADP) 2.6 (Apo)	Zaitseva 2006 Schmitt 2003
				2PMK	1.6 (TNP-ADP)	Oswald 2008

Exportateurs ABC	HlyB (S504A)	<i>E. coli</i>	Hémolysine	3B5J	2.0 (TNP-ADP)	Oswald 2008
	HlyB (H662A)	<i>E. coli</i>	Hémolysine	2FFA	1.7 (ADP)	Zaitseva 2006
				2FGJ	2.6 (ATP)	
				1XEF	2.5 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	
	LptB (K42A, E163A)	<i>E. coli</i>	LPS	4QC2	2.2 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Wang 2014
	LptB	<i>E. coli</i>	LPS	4P31	2.05 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	Sherman 2014
				4P32	1.55 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	
	LptB (E163Q)	<i>E. coli</i>	LPS	4P33	1.65 (ATP-Na+)	Sherman 2014
	NB1 de MRP1	<i>Homo sapiens</i>	Multiples drogues	4C3Z	2.1 (SO4)	Chaptal 2014
				2CBZ	1.5 (ATP-Mg2+)	Ramaen 2006
	TAP1	<i>Homo sapiens</i>	Peptides	1JJ7	2.4 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	Gaudet 2001
	TAP1 (D645N, D651A)	<i>Rattus norvegicus</i>		4K8O	2.65 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Grossmann 2014
	TAP1 (D645N)			2IXE	2.0 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Procko 2001
	TAP1 (S621A, G622V, D645N)			2IXG	2.7 (ATP)	
	TAP1 (D645Q, Q678H)			2IXF	2.0 (ATP-Mg2+)	
ABCB6	<i>Homo sapiens</i>	Multiple drogues	3NH6	2.0 (Apo ouverte)	Haffke 2010	
			3NH9	2.1 (ATP)		
			3NHA	2.1 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )		
			3NHB	2.15 (ADP)		
ComA (E690A)	<i>Streptococcus mutans</i>	Peptide	3VX4	2.7 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Ishii 2013	
LIC12079	<i>L. interrogans</i>	Cations divalents	4HZI	1.85 (Apo)	Benaroudj 2013	
LmrA	<i>Lactococcus lactis</i>	Antibiotiques	1MV5	3.1 (ATP et ADP)	Yuan 2002	
Canal ionique	NBD1 de CFTR (Δ405-436)	<i>Homo sapiens</i>	Ions chlorures	2PZE	1.7 (ATP-Mg2+)	Atwell 2010
	2PZG			1.8 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )		
	2PZF			2.0 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )		
	NBD1 de CFTR (ΔF508)			1XMJ	2.3 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Lewis 2005
				3SI7	2.25 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Mendoza 2012
NBD1 de CFTR (F508A)		1XMI	2.25 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Lewis 2005		

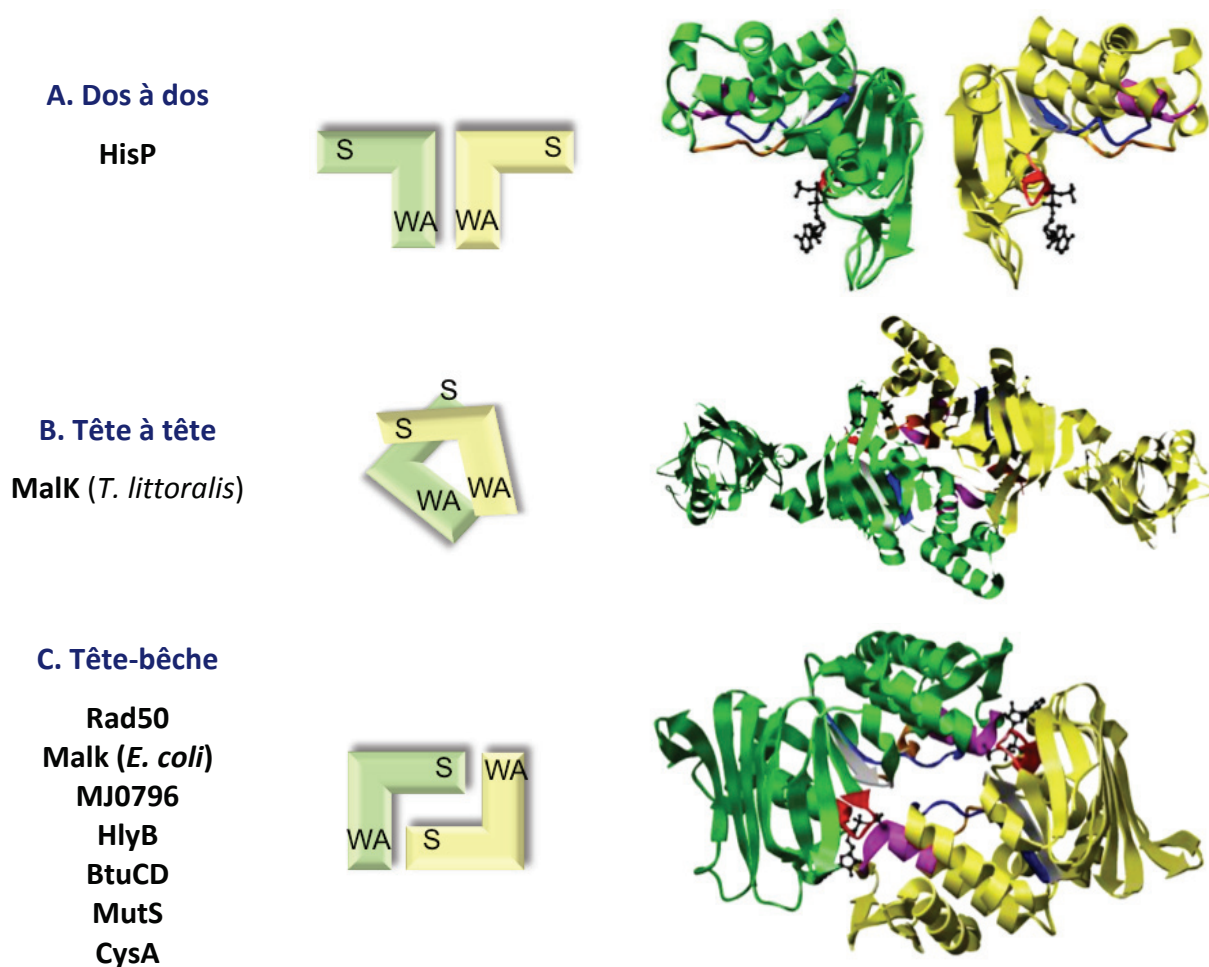
	NBD1 de CFTR (F508R)	Mus musculus	Ions chlorures	1XFA	3.1 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Thibodeau 2005
	NBD1 de CFTR (F508S)			1XF9	2.7 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	
	NBD1 de CFTR	Mus musculus	Ions chlorures	1R0Z	2.35 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Lewis 2004
				1Q3H	2.5 (AMPPNP)	
				1R0W	2.2 (Apo)	
				1R0X	2.2 (ATP)	
				1R0Y	2.55 (ADP)	
				1R10	3.0 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	
	NBD1 de CFTR (F409L, F429S, F433L, G550E, R553Q, R555K, H667R)	Homo sapiens	Ions chlorures	2BBO	2.55 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	Lewis 2010
	NBD1 de CFTR (F429S, F494N, Q636R)			2BBS	2.05 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )	
NBD1 de CFTR (F504N, Q646R)	2BBT			2.3 (ATP-Mg <sup>2+</sup> )		
Superfamille ABC	MJ0796	M. jannaschii	Inconnue	3TIF	1.8 (ADP-Na <sup>+</sup> )	Zoghbi 2012
				1F30	2.7 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	Luo 2000
				1L2T	1.9 (ATP-Na <sup>+</sup> )	Smith 2002
	MJ1267	M. jannaschii	Inconnue	1GAJ	2.5 (Apo)	Karpowich 2001
				1G6H	1.6 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	
				1G9X	2.6 (ADP-Mg <sup>2+</sup> )	Yuan 2003
TM1139	T. maritima	Inconnue	1JIO	2.0 (ATP)	Zhang 2001	
Transporteurs ABC de classe II	Rad50	P. furiosus	Réparation de l'ADN	1F2T	1.6 (Apo)	Hopfner 2000
				1F2U	1.6 (ATP)	
	Rad50 (R805E)			4NCJ	2.0 (ADP)	Deshpande 2014
	Rad50 (L802W)			4NCH	2.3 (Apo)	
	Rad50 (R797G)			4NCK	2.0 (Apo)	
	Muts			E. coli	Réparation de l'ADN	1E3M
		T. aquaticus	1EWQ	2.2 (ADN)		Obmolova 2000
			1EWR	3.2 (Apo)		

**Tableau 4 : Les structures cristallographiques des NBDs de transporteurs ABC.**

PDB: Protein Data Bank, Apo: Absence de nucleotide, ATP: Adenosine-5'-triphosphate, ADP: Adenosine-5'-diphosphate, AMPPNP: Adénosine-5'-( $\beta$ - $\gamma$ -imido)triphosphate.

### c) Les interactions entre les domaines NBDs

Les structures de NBD isolées résolues par cristallographie aux rayons X ont permis de mettre en évidence trois conformations différentes de dimère de NBD : Dos à dos (figure 12a), tête à tête (figure 12b) et tête-bêche (figure 12c) (Kerr et *al.*, 2002).



**Figure 12. Représentations schématiques et exemples de structures de dimère de NBD.**

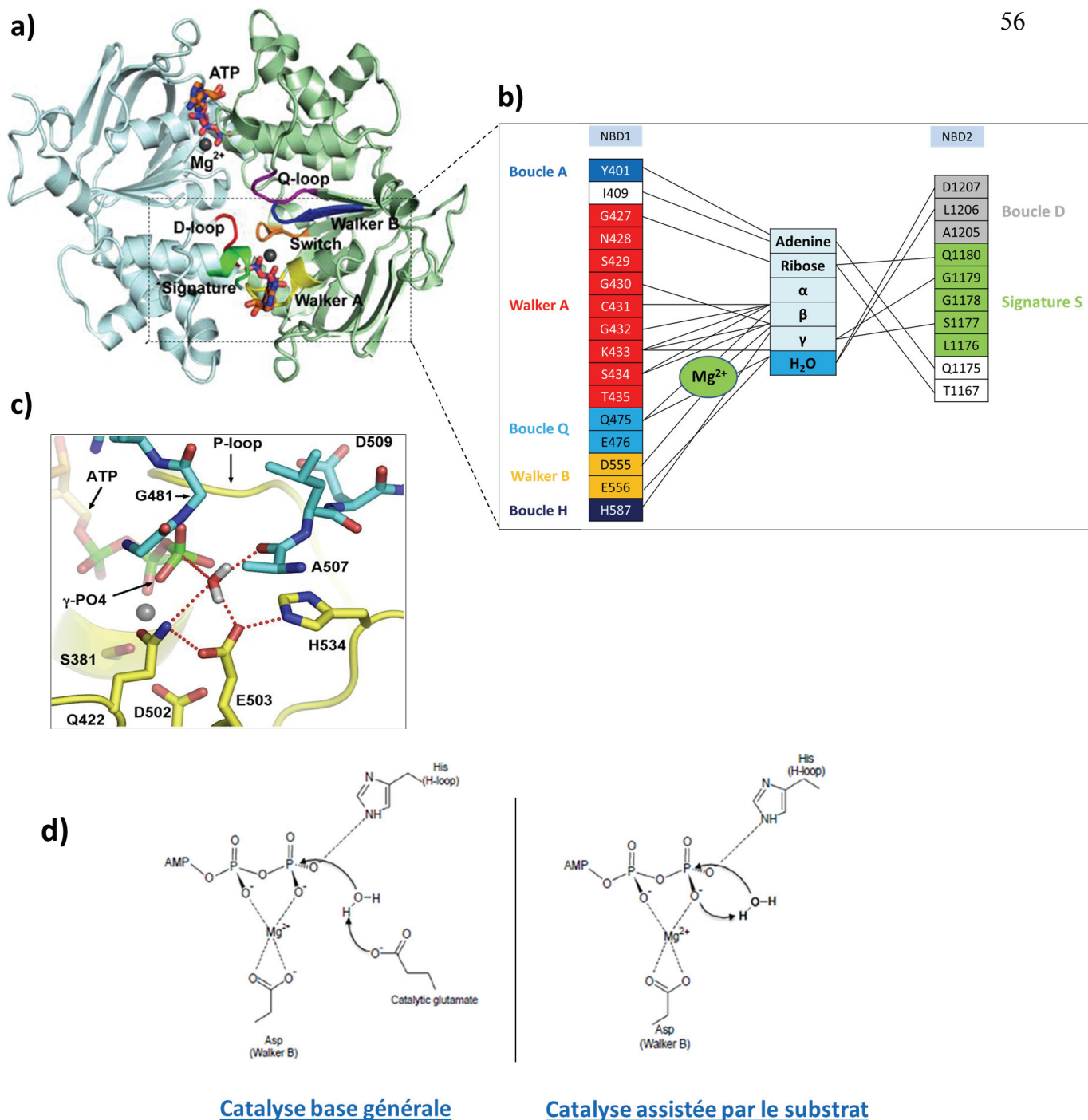
Adapté de Kerr et *al.*, 2002.

- A. Modèle dos à dos et structure du dimère HisP de *Salmonella typhimurium* (PDB: 1BOU).  
B. Modèle tête à tête et structure du dimère MalK de *Thermococcus littoralis* (PDB: 1G29).  
C. Modèle tête-bêche et structure du dimère Rad50 de *Pyrococcus furiosus* (PDB: 1F2U).

Les symboles S et WA désignent respectivement la signature ABC et le motif Walker A. Les motifs conservés sont coloriés en rouge (Walker A), orange (boucle Q), magenta (signature ABC), bleu foncé (Walker B) et gris (boucle H). La molécule d'ATP est en noir.

En 1998, la structure cristallographique du dimère de NBD de la protéine HisP de *S. typhimurium* en complexe avec l'ATP (Hung et al., 1998) a permis de montrer que les deux domaines nucléotidiques s'associaient dans une orientation dos à dos (figure 12a). Mais cette structure fut remise en cause car elle révélait une absence d'interaction entre la signature S et les deux molécules d'ATP. Deux ans plus tard, Diederichs et ses collaborateurs montrèrent que les NBDs du transporteur de maltose (Malk) de *Thermococcus litoralis* s'associaient dans une conformation tête à tête (figure 12b) (Diederichs et al., 2000). Malk fut cristallisé en présence d'ADP mais les nucléotides n'étaient pas visibles. La même année, la structure de la protéine Rad50 de *Pyrococcus furiosus* en complexe avec l'AMPPNP-Mg<sup>2+</sup> (un analogue non hydrolysable de l'ATP) (Hopfner et al., 2000) permit de montrer que le dimère s'organisait dans une conformation tête-bêche (figure 12c). Les deux sites de fixation des nucléotides se retrouvent face à face et sont reliés par une symétrie d'ordre 2. Chaque molécule d'ATP interagit avec les motifs Walker A, Walker B, les boucles Q et H appartenant à un domaine nucléotidique ainsi qu'avec la signature S de l'autre domaine. Cet arrangement est considéré comme la conformation physiologique car toutes les structures cristallographiques de dimères de NBD et de transporteurs ABC entiers obtenues ultérieurement ont confirmé la pertinence de ce modèle (figure 12C). Dans cette conformation, le nucléotide est stabilisé grâce aux interactions de la signature S avec le ribose et le phosphate  $\gamma$  de l'ATP (figure 13b) (Smith et al., 2002). Aujourd'hui, l'ensemble des études s'accordent sur le fait que le site de fixation de l'ATP comprend les motifs A et B de Walker d'un NBD en association avec la signature S de l'autre NBD (figure 13a) (Zaitseva et al., 2005; Jones et Georges, 2004).



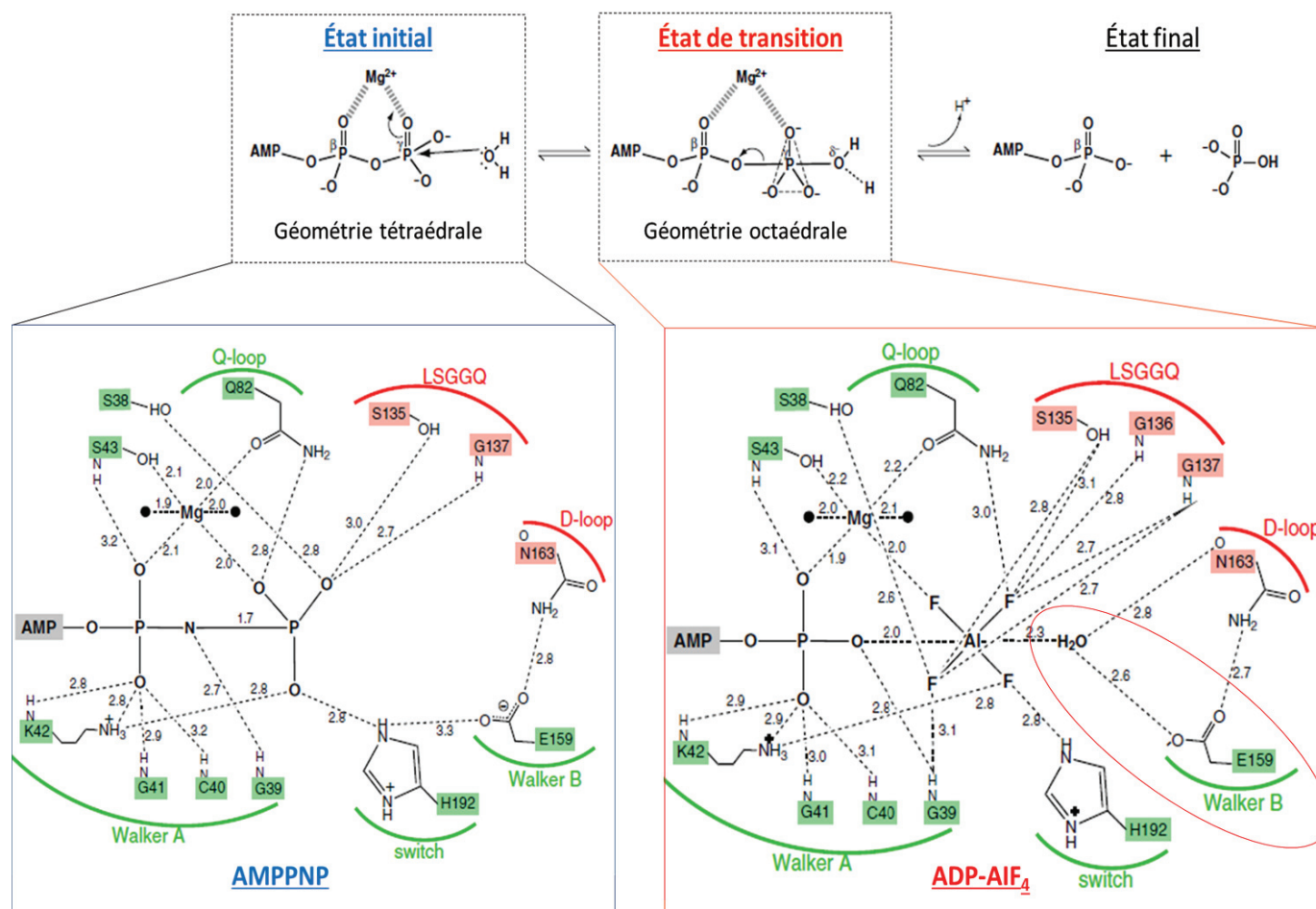




#### d) Le mécanisme d'hydrolyse de l'ATP

Les structures cristallographiques de dimère de NBD ont permis de mieux comprendre les interactions de l'ATP avec les résidus des motifs conservés (figure 13b), en revanche, le mécanisme d'hydrolyse de l'ATP fait encore l'objet d'un vif débat au sein de la communauté scientifique. Deux modèles ont été proposés (figure 13 c-d) : la catalyse base générale (Orelle et *al.*, 2003; Geourjon et *al.*, 2001) et la catalyse assistée par le substrat (Jones et Georges, 2012; Hanekop et *al.*, 2006; Zaitseva et *al.*, 2005). Dans le premier, le résidu glutamate, situé après l'aspartate du motif B de Walker, agit comme une base pour déprotoner une molécule d'eau. L'attaque nucléophile de l'atome de phosphore entraîne ensuite la rupture de la liaison entre les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP. Dans le second cas, la molécule d'eau est déprotonée par l'atome d'oxygène du phosphate  $\gamma$  de l'ATP. Cet oxygène établit une liaison de coordination avec le résidu histidine de la boucle H alors que le glutamate du Walker B stabilise la position de l'histidine.

L'attaque nucléophile du phosphate  $\gamma$  de l'ATP par une molécule d'eau aboutit à la formation d'un état de transition pentavalent (Davies et *al.*, 2004). La géométrie tétraédrale du phosphate  $\gamma$  devient octaédrique (figure 14). En 2011, Oldham et Chen sont parvenus à résoudre les structures intermédiaires catalytiques du transporteur de maltose d'*E.coli*, MBP-MalFGK<sub>2</sub> (Oldham et Chen, 2011). La protéine sauvage a été cristallisée en présence d'AMPPNP-Mg<sup>2+</sup> (PDB : 3RLF) pour obtenir la structure pré-hydrolytique du transporteur et d'ATP-Mg<sup>2+</sup> avec de l'orthovanadate (VO<sub>3</sub><sup>3-</sup>) (PDB : 3PUV), du fluorure d'aluminium (AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>) (PDB : 3PUW) ou du fluorure de béryllium (BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>) (PDB : 3BUX). Après hydrolyse de l'ATP, ces complexes de métaux interagissent avec l'ADP et se substituent au phosphate  $\gamma$  pour stabiliser un intermédiaire catalytique (Shimizu et Johnson, 1983). Dans les structures de MalFGK<sub>2</sub>-AMPPNP ou ADP-BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>, le phosphate  $\gamma$  adopte une géométrie tétraédrale (état initial). En revanche, dans celles de MalFGK<sub>2</sub> complexé à l'ADP-VO<sub>3</sub><sup>3-</sup> ou à l'ADP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>, l'analogue du phosphate  $\gamma$  présente une géométrie octaédrale (état de transition). Les structures de MalFGK<sub>2</sub>-AMPPNP et ADP-VO<sub>3</sub><sup>3-</sup> sont identiques. Les seules différences structurales entre l'état initial et transitoire reposent sur la conformation du phosphate  $\gamma$  de l'ATP et la présence d'une molécule d'eau (figure 14). Dans la structure avec ADP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>, le résidu glutamate E159 du motif Walker B établit une liaison hydrogène avec la molécule d'eau nucléophile. La mutation de ce résidu par une glutamine (forme protonée du glutamate), abolit l'hydrolyse de l'ATP. A cette position, la présence d'une base forte semble donc apparaître essentielle. D'autres études tendent à confirmer la pertinence du modèle de catalyse base générale (Chaptal et *al.*, 2014).



**Figure 14 : Illustrations schématiques des liaisons établies avec l'AMPPNP (état initial) et l'ADP-AIF<sub>4</sub> (état transitoire).** Adapté d'Oldham et Chen (2011).

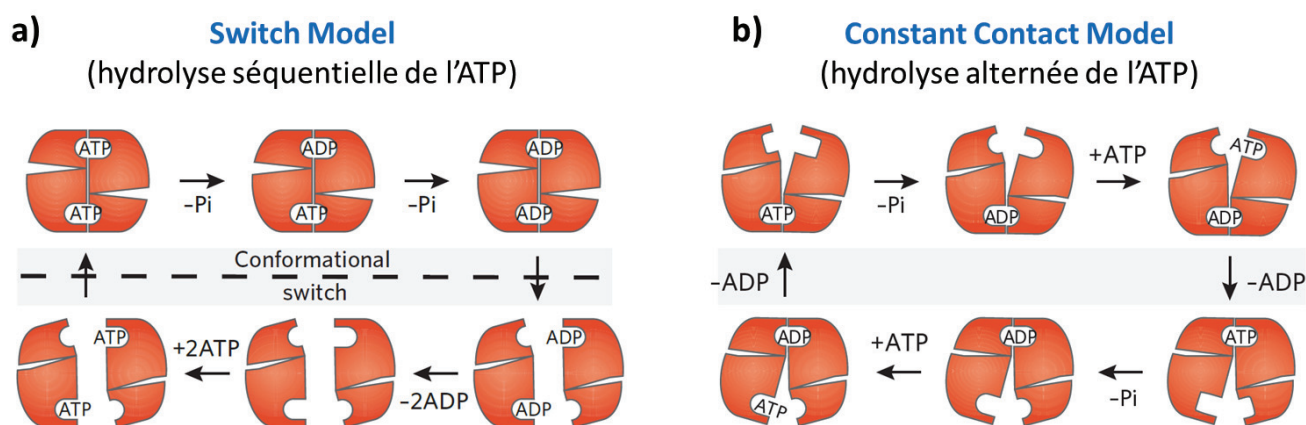
Les résidus des monomères de MalK sont colorés en vert et rouge. Les liaisons hydrogènes et les interactions avec le magnésium sont en pointillé et la distance des liaisons est indiquée en angströms (Å).

### e) Le cycle catalytique d'hydrolyse de l'ATP

De 2002 à 2015, dix structures de transporteurs ABC entiers procaryotes et quatre structures eucaryotes ont été résolues par cristallographie aux rayons X. Malgré tout, aucun consensus n'a encore été trouvé concernant le mécanisme du cycle catalytique d'hydrolyse de l'ATP. Deux modèles principaux ont été proposés (figure 15) :

⊕ Le « **Switch Model** » (Higgins et Linton, 2004; Linton et Higgins, 2007), également appelé « **processive clamp** » (van der Does et Tampe, 2004; Janas et *al.*, 2003) ou « **tweezers-like** » (Chen et *al.*, 2003), s'appuie sur les structures de Sav1866, MsbA et P-gp obtenues seules et en complexe avec des nucléotides. La fixation de deux molécules d'ATP induit la dimérisation des NBDs. L'hydrolyse de l'ATP entraîne la libération de l'ADP et du phosphate inorganique et la dissociation des deux NBDs (20-30 Å). Les changements conformationnels conduisant à la translocation du substrat sont déclenchés par la fixation de l'ATP alors que l'hydrolyse de l'ATP permet le retour du transporteur à sa conformation initiale.

⊕ L'« **alternating site model** » fut proposé en 1995 par Senior et ses collaborateurs. Ils observèrent en présence de vanadate (qui se substitue au phosphate  $\gamma$  de l'ATP après hydrolyse) qu'une molécule d'ADP-Vi était présente dans un seul des deux NBDs du dimère de P-gp (Senior et *al.*, 1995). Ils en déduisirent que l'hydrolyse de l'ATP se produisait alternativement sur chaque NBD. Selon ce modèle, il existe un état intermédiaire dans lequel les deux molécules d'ATP sont fixées. Un nouveau modèle a été proposé en 2009, le « **Constant Contact Model** » (Jones et Georges, 2009) dans lequel la fixation simultanée de deux molécules d'ATP ne se produit pas. Les deux NBDs sont toujours en contact et les molécules d'ATP sont hydrolysées alternativement. La libération de l'ADP et du phosphate inorganique se produit lors de la réaction d'hydrolyse de la molécule d'ATP fixée dans l'autre cavité.



**Figure 15 : Les deux modèles proposés pour le cycle catalytique d'hydrolyse de l'ATP.**  
D'après Parcej et Tampé, 2010.

Le débat fait actuellement rage au sein de la communauté scientifique pour déterminer si les NBDs se séparent ou au contraire restent en contact constant durant l'hydrolyse de l'ATP. Nous discuterons de la pertinence physiologique de chacun de ces modèles dans la partie suivante après avoir décrit l'ensemble des structures cristallographiques de transporteurs ABC entiers.

#### f) Les NBDs asymétriques

Chez les eucaryotes, plusieurs transporteurs ABC entiers (CFTR, SUR1 ou MRP1) et hétérodimériques (TAP1/TAP2, ABCG5/ABCG8) disposent de NBDs dans lesquels le motif Walker B, la région switch et la signature S dévient de leur séquence consensus (Jones et Georges, 2013) (tableau 5). Dans TAP1 par exemple, le résidu catalytique glutamate du Walker B est muté en aspartate et l'histidine de la région Switch est remplacé par une glutamine; alors que dans TAP2, Les résidus sérine et glycine de la signature S sont mutés en deux alanines (Procko et *al.*, 2009).

Ces mutations correspondent au même site de fixation de l'ATP. Il est considéré comme « dégénéré ou non catalytique ». Le second site est lui en accord avec la séquence des motifs conservés, il est désigné « site consensus ». Des études de mutagenèse réalisées sur les résidus du site dégénéré confirment que les transporteurs TAP1/TAP2, MRP1, CFTR,

ABCC9 et ABCG5/ABCG8 conservent une partie de leur activité. En revanche, ils perdent toute activité de transport lorsque le site consensus est rendu inactif (Perria et *al.*, 2006; Park et *al.*, 2008; Zhang et *al.*, 2006; Basso et *al.*, 2003; Hou et *al.*, 2000).

Cette asymétrie est aussi retrouvée chez plusieurs exportateurs ABC bactériens hétérodimériques (LmrCD, PatAB, BmrCD and TmrAB), ce qui laisserait supposer que l'hydrolyse d'une seule molécule d'ATP a lieu par cycle de transport. D'autant plus que des expériences de mutagenèse réalisées sur le transporteur d'histidine d'*E. coli*, HisP<sub>2</sub>MQJ, confirment qu'un seul site d'hydrolyse de l'ATP pourrait être suffisant pour les transporteurs homodimériques avec deux sites consensus (Nikaido et Ames, 1999). Ce n'est cependant pas une vérité générale puisque dans le cas du transporteur de maltose MalEFGK<sub>2</sub>, les deux sites d'hydrolyse de l'ATP sont nécessaires (Davidson et Sharma, 1997). Ces études suggèrent que selon les transporteurs ABC une ou deux molécules d'ATP seraient consommées pour une molécule de substrat transporté.

Les conséquences fonctionnelles de cette différence de stœchiométrie ne sont pas encore très claires. Malgré tout, même en présence de deux sites consensus, il est probable que l'hydrolyse de l'ATP ne soit pas simultanée sur les deux sites (constant contact model). L'asymétrie des NBDs pourraient alors être une caractéristique généralisable à l'ensemble des transporteurs ABC (Mittal et *al.*, 2012). Nous discuterons du possible rôle de cette asymétrie dans le transport des substrats lorsque nous aborderons la description de la structure de l'exportateur hétérodimérique TM287/288 de *Thermotoga maritima*.

**Tableau 5 : Asymétrie des motifs conservés chez plusieurs transporteurs ABC eucaryotes.**  
D'après Procko et al., 2009.

Transporteur	NBD	Walker A	Boucle Q	Signature ABC	Walker B	Boucle D	Switch
<b>ABCA8</b> ( <i>M. musculus</i> )	1	515 GHSGAGKST	562 CPQAN	616 LSGGQ	636 IFLLDE	644 AGLD	670 STQFM
	2	1321 GHNGAGKST	1362 CPQEN	1416 LSEGV	1436 ILLLDE	1444 TGLD	1472 TTHYM
<b>ABCA9</b>	1	517 GHSGAGKTT	564 CPQSN	618 LSGGQ	638 VLLLDE	646 AGLD	672 STQFI
	2	1326 GHNGAGKST	1367 CPQEN	1421 LSEGI	1441 VVLLDE	1449 TGMD	1477 TTHYM
<b>ABCA10</b>	1	427 GHNGAGKST	474 CPQFN	528 LSGGQ	548 VLLLDE	556 AGLD	582 STQFM
	2	1239 GHNGAGKST	1286 CPQEN	1340 LSEGI	1360 VVLLDE	1368 TGMD	1396 TTHYM
<b>ABCA12</b>	1	1378 GPNAGKTT	1423 CMQHD	1479 LSGGM	1499 VVILDE	1507 TGVD	1533 STHHL
	2	2290 GVNGAGKTT	2336 CPQED	2390 CSYGT	2410 ILLLDE	2418 SGMD	2445 TSHSM
<b>ABCB2 (TAP1)</b>	1	538 GPNVSGKST	584 VGQEP	643 LSGGQ	663 VLILDD	671 SALD	699 ITQHL
<b>ABCB3 (TAP2)</b>	1	503 GPNVSGKST	549 VGQEP	606 LAAGQ	626 VLILDE	634 SALD	659 IAHRL
<b>ABCB11 (BSEP)</b>	1	455 GPSGAGKST	501 VEQEP	559 MSGGQ	579 ILLLDM	587 SALD	613 VAHRL
	2	1113 GSSGCGKST	1159 VSQEP	1219 LSRGE	1239 ILLLDE	1247 SALD	1273 IAHRL
<b>ABCC1 (MRP1)</b>	1	678 GQVGCCKSS	711 VPQQA	768 LSGGQ	788 IYLFDD	796 SAVD	825 VTHSM
	2	1327 GRTGAGKSS	1373 IPQDP	1430 LSVGQ	1450 ILVLDE	1458 AAVD	1484 IAHRL
<b>ABCC2 (MRP2)</b>	1	671 GPNVSGKSS	704 VPQQS	761 LSGGQ	781 IYLLDD	789 SAVD	818 VTHSM
	2	1334 GRTGAGKSS	1380 IPQDP	1437 LSGQ	1457 ILVLDE	1465 AAVD	1491 IAHRL
<b>ABCC3 (MRP3)</b>	1	661 GPNVSGKSS	694 VPQQA	751 LSGGQ	771 IFLLDD	779 SAVD	808 VTHGI
	2	1323 GRTGAGKSS	1369 IPQDP	1426 LSVGQ	1446 ILVLDE	1454 AAID	1480 IAHRL
<b>ABCC4 (MRP4)</b>	1	445 GPNVSGKSS	478 VSQQP	535 LSGGQ	555 IYLLDD	563 SAVD	590 VTHQL
	2	1075 GRTGAGKSS	1120 IPQEP	1177 FSVGQ	1197 ILIIDE	1205 ANVD	1231 IAHRL
<b>ABCC5 (MRP5)</b>	1	595 GSVSGKTS	628 VAQQA	685 LSGGQ	705 IYILDD	713 SALD	740 VTHQL
	2	1227 GRTGSGKSS	1273 IPQEP	1330 FSVGE	1350 ILILDE	1358 AAMD	1384 IAHRL
<b>ABCC6 (MRP6)</b>	1	663 GPNVSGKSS	696 VPQEA	753 LSGGQ	773 VYLLDD	781 AALD	810 VTHAL
	2	1299 GRTGAGKSS	1345 IPQDP	1402 LSVGQ	1422 ILILDE	1430 AAVD	1456 IAHRL
<b>ABCC7 (CFTR)</b>	1	458 GSTGAGKTS	491 CSQFS	548 LSGGQ	568 LYLLDS	576 GYLD	603 VTSKM
	2	1244 GRTGSGKST	1289 IPQKV	1346 LSHGH	1366 ILLLDE	1378 AHLD	1400 CEHRI
<b>ABCC8 (SUR1)</b>	1	712 GQVGCCKSS	771 ASQKP	828 LSGGQ	848 VVFLDD	856 SALD	885 VTHKL
	2	1377 GRTGSGKSS	1423 ILQDP	1480 FSQGG	1500 IFIMDE	1508 ASID	1534 IAHRV
<b>ABCC9 (SUR2)</b>	1	705 GQVGCCKSS	755 AAQKP	812 LSGGQ	832 IVFLDD	840 SALD	869 VTHKL
	2	1346 GRTGSGKSS	1392 ILQDP	1449 FSVGQ	1469 ILIMDE	1477 ASID	1503 MAHRV
<b>ABCC10 (MRP7)</b>	1	605 GKVGCCKSS	641 ATQEP	698 LSGGQ	718 LYLLDD	726 AAVD	753 CTHRT
	2	1252 GRTGSGKSS	1298 IPQEP	1354 LSLGQ	1374 ILCIDE	1382 ASVD	1408 IAHRL
<b>ABCC11 (MRP8)</b>	1	544 GNTGSGKSS	577 VPQQA	634 LSGGQ	654 IYLLDD	662 SAVD	689 VTHQL
	2	1175 GRTGSGKSS	1221 IPQDP	1278 FSVGE	1298 IILIDE	1306 ASID	1332 IAHRV
<b>ABCF1 (ABC50)</b>	1	298 GPNVSGKTT	342 VLRAD	414 FSGGW	434 LLMLDE	442 NHLD	466 VSHDQ
	2	620 GPNVSGKST	655 FNQQY	705 LSGGQ	725 VLILDE	733 NNLD	757 VSHDA
<b>ABCF2</b>	1	118 GLNGIGKSM	162 VMEVD	229 FSGGW	249 MLLLDE	257 NHLD	281 VSHSQ
	2	430 GPNVSGKST	465 YHQHL	517 LSDGQ	537 MLFLDE	545 NHLD	569 VSHDF
<b>ABCF3</b>	1	210 GRNGLGKTT	254 VLES	328 FSGGW	348 LLLLDE	356 NMLD	380 VSHDR
	2	525 GENGAGKST	560 FSQHH	611 LSGGQ	631 FYILDE	639 NHLD	663 VSHDE
<b>ABCG5</b>	1	86 GSSGSGKTT	132 VLQSD	193 ISTGE	213 VMLFDE	221 TGLD	248 TIHQP
<b>ABCG8</b>	1	105 GSSGCGRAS	151 VRQHN	213 LSGGE	233 ILILDE	241 SGLD	268 SLHQP
<b>Consensus</b>		GxxGxGKST	xxQxx	LSGGQ	φφφφDE	SALD	xxHxx

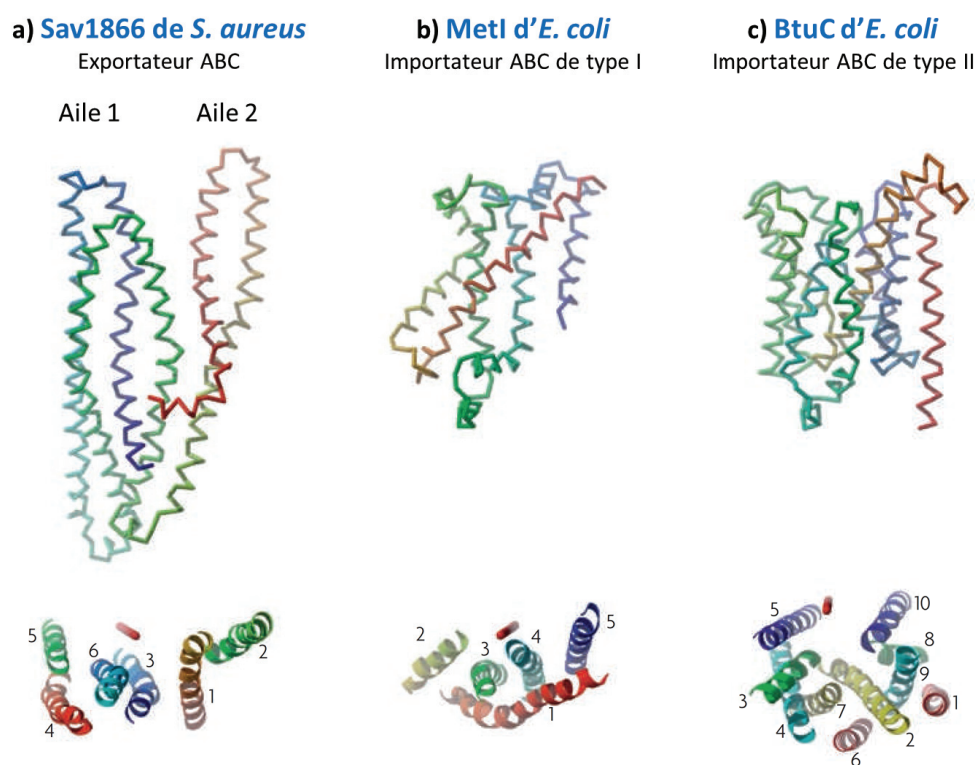
Les substitutions non consensus sont coloriées en jaune. Dix-neuf de ces transporteurs sont entiers et deux sont hétéro-dimériques (TAP1/TAP2, ABCG5/ABCG8).



## Les domaines transmembranaires (TMDs)

### a) La conformation des domaines transmembranaires

Les domaines transmembranaires sont constitués d'hélices  $\alpha$  hydrophobes qui traversent la membrane plasmique afin de créer une voie de translocation pour les différents substrats. Les exportateurs ABC contiennent généralement douze hélices  $\alpha$ , six pour chaque TMD. Chez les importateurs, ce nombre peut varier de cinq à onze passages transmembranaires pour un même TMD (Biemans-Oldehinkel et *al.*, 2006). Dix à douze hélices transmembranaires semblent être le minimum nécessaire pour former un pore au sein duquel divers substrats pourront traverser la membrane plasmique (Locher et *al.*, 2002). A la différence des domaines nucléotidiques, la séquence primaire des TMDs est peu conservée parmi les espèces, ce qui est en accord avec la grande variété de substrats que l'on peut retrouver au sein de cette famille de protéines. Les structures cristallographiques de transporteurs ABC complets ont permis de mettre en évidence trois repliements distincts des TMDs (figure 16) (Rees et *al.*, 2009). Les domaines transmembranaires des importateurs ABC présentent des différences structurales, ce qui a conduit à les classer en deux catégories (figure 16b et c) (Locher 2009).



**Figure 16 : Le repliement des domaines transmembranaires.**

D'après Rees et *al.*, 2009.

**a)** L'exportateur Sav1866 de *Staphylococcus aureus* (PDB: 2ONJ). **b)** L'importateur de type I, MetNI d'*Escherichia coli* (PDB: 3DHW). **c)** L'importateur de type II, BtuCD d'*Escherichia coli* (PDB: 1L7V). Dans la partie supérieure de la figure, le repliement de l'un des domaines transmembranaires de chaque transporteur ABC est représenté, avec un gradient de couleur

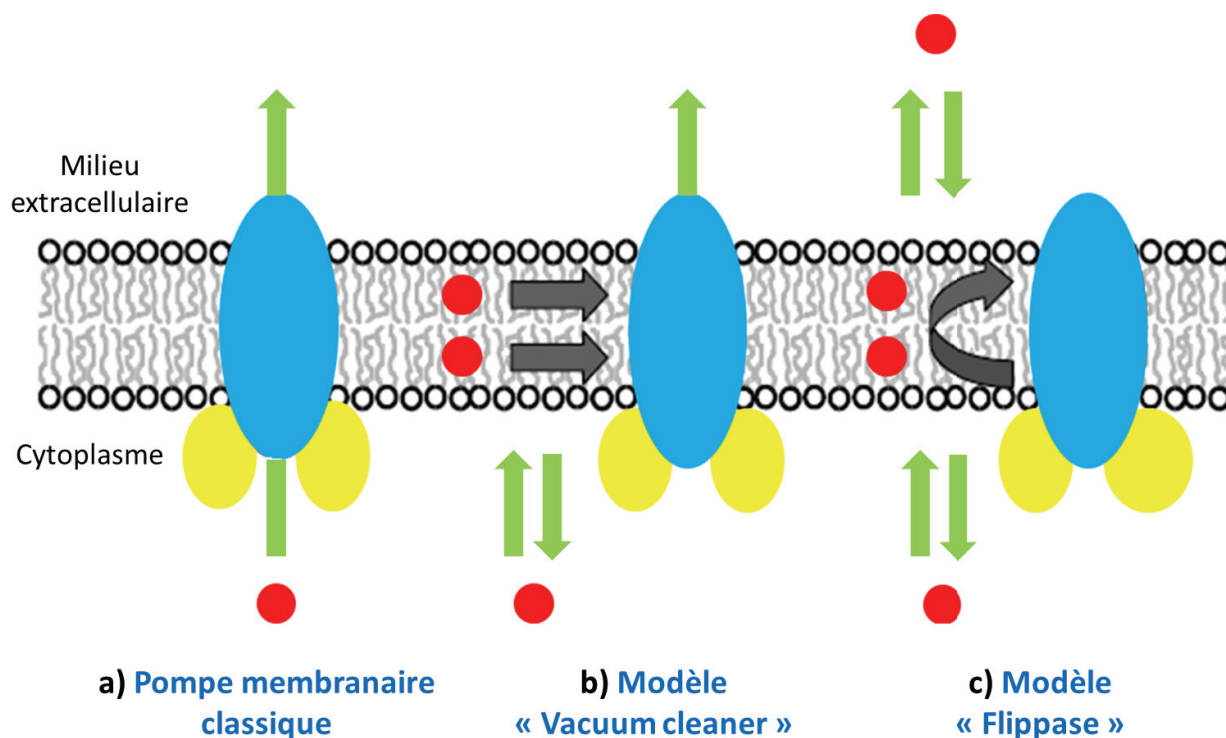
allant du rouge (extrémité N-terminale) vers le bleu (extrémité C-terminale). Dans la partie inférieure de la figure, les hélices  $\alpha$  transmembranaires sont représentées sous la forme « ribbon » et observées du côté périplasmique de la membrane.

- ✚ La topologie de tous les exportateurs ABC est identique à celle de Sav1866 de *Staphylococcus aureus* (Dawson et Locher 2006). Ce dernier est composé de six hélices  $\alpha$  transmembranaires par monomère (figure 16a), soit douze pour le transporteur complet. Sav1866 adopte une conformation dans laquelle les hélices  $\alpha$  sont orientées dans deux directions opposées, formant deux ailes (« wings ») séparées l'une de l'autre vers l'extérieur de la cellule. Les TMDs ne forment pas des faisceaux réguliers et individuels d'hélices  $\alpha$  car chaque aile est constituée des TM1 et 2 d'un domaine transmembranaire et des TM3 à 6 de l'autre. À l'intérieur d'un TMD, les hélices TM1 à 3 sont reliées aux TM4 à 6 par une symétrie d'ordre 2 (rotation de 180° autour d'un axe de symétrie parallèle au plan de la membrane). Les hélices  $\alpha$  transmembranaires sont reliées par des boucles extra- et intracellulaires, importantes dans la reconnaissance des substrats, le mécanisme de transport et l'interaction avec les NBDs. Nous reviendrons plus en détails sur le rôle de ces boucles lorsque nous aborderons la description des structures cristallographiques de transporteurs ABC complets.
- ✚ Les importateurs de type I regroupent l'importateur de molybdate ModB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> (Hollenstein et al., 2007), l'importateur de maltose MalFGK<sub>2</sub> (Oldham et al., 2007) et celui de méthionine MetNI (Kadaba et al., 2008). Ce dernier est composé de cinq hélices  $\alpha$  par domaine transmembranaire (figure 16b). Les hélices TM2 à 5 forment la voie de translocation des substrats alors que le TM1 recouvre la surface externe du TMD en interagissant avec le TM4.
- ✚ Les importateurs de type II, BtuCD (Locher et al., 2002), HI1470/1 (Pinkett et al., 2007) et HmuUV (Mattle et al., 2010), comprennent dix hélices  $\alpha$  par TMD, soit vingt pour le transporteur complet (figure 16c). Ces hélices s'organisent de façon complexe avec le TM2 positionné au centre du domaine transmembranaire. Les TM2 à 5 et 7 à 10 de BtuC adoptent une topologie identique mais avec une polarité inversée. Les hélices TM5 et 10 se situent à l'interface des deux domaines transmembranaires.

## b) L'accès des substrats aux transporteurs

Les substrats transportés par les exportateurs ABC sont de nature hydrophobe et de petite taille, ce qui leur permet de franchir la bicouche lipidique pour entrer à l'intérieur des cellules. Trois modèles ont été décrits pour expliquer le mécanisme de transport des médicaments par les exportateurs ABC (figure 17) :





**Figure 17 : Les mécanismes de transport de médicaments par les exportateurs ABC.**

*D'après Sharom et al., 2006.*

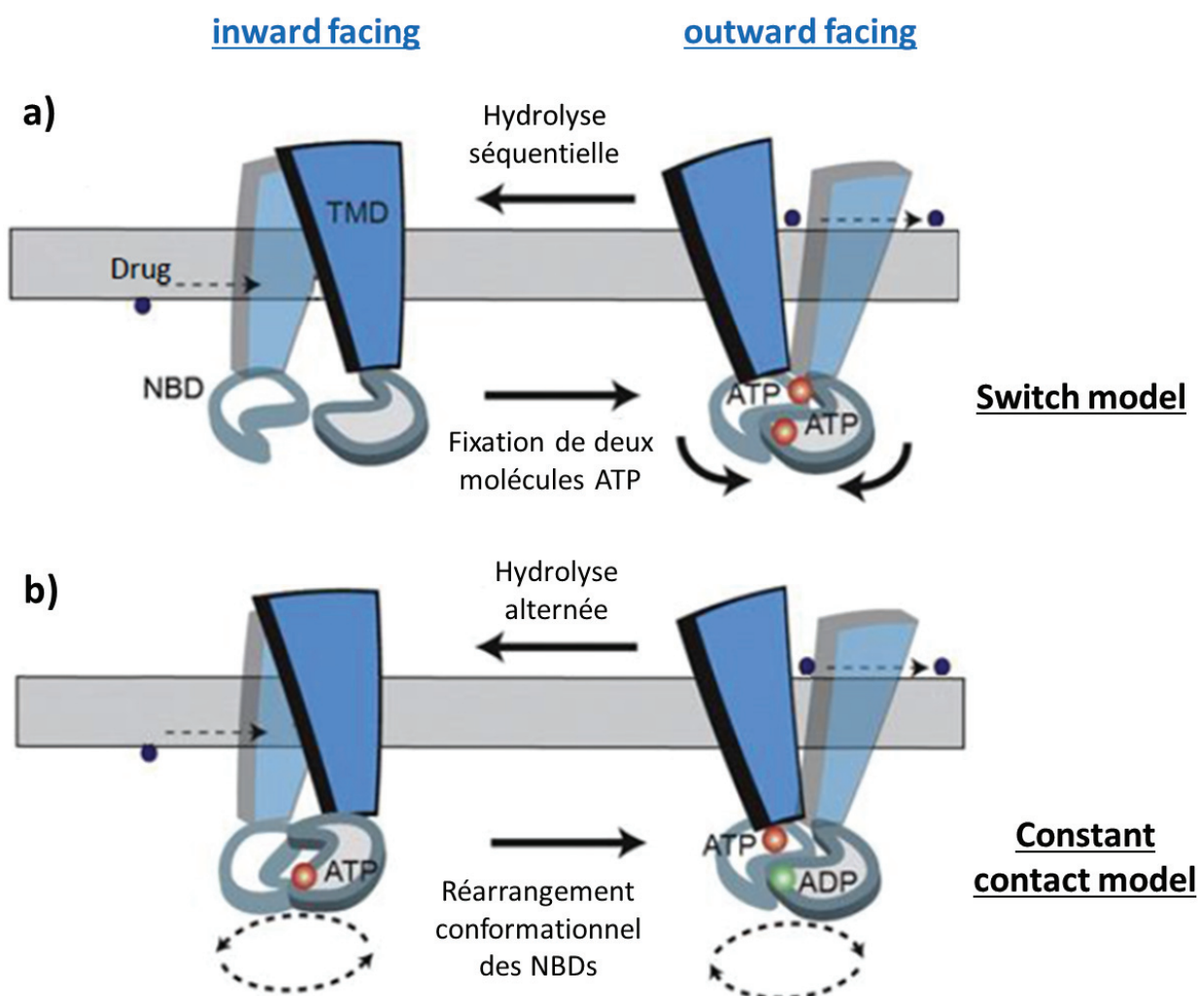
Les domaines transmembranaires sont colorés en bleu, les domaines cytoplasmiques en jaune et les molécules de substrat en rouge.

- ⊕ Dans le **modèle de la pompe membranaire classique** (figure 17a), les substrats situés dans le cytoplasme interagissent avec l'exportateur ABC et sont libérés dans le milieu extracellulaire. Dans ce cas, les médicaments sont transportés à travers un pore hydrophile et n'entrent jamais en contact avec la bicouche lipidique (Higgins et al., 2004).
- ⊕ Le **modèle « Vacuum cleaner »** (ou aspirateur hydrophobe) (figure 17b) repose sur le fait que les substrats hydrophobes répartis au sein de la bicouche lipidique interagissent avec le transporteur et sont ensuite relargués directement dans le milieu extracellulaire (Gottesman et al., 1993).
- ⊕ D'après le **modèle « Flippase »** (figure 17c), le substrat interagit dans un premier temps avec le feuillet interne de la membrane plasmique où il diffuse latéralement jusqu'à ce qu'il se fixe à l'un des sites du transporteur. Ce dernier fait ensuite basculer la molécule de substrat dans le feuillet externe, où il peut à nouveau diffuser latéralement avant d'être libéré dans le milieu extracellulaire (Higgins et al., 1992).

### c) La translocation des substrats

En 1966, Jardetzky proposait un modèle « alternating access » pour expliquer la translocation des substrats à travers la membrane (figure 18). Les transporteurs ABC alternent

entre deux conformations, l'une ouverte vers le cytoplasme (« inward facing conformation ») et l'autre ouverte vers l'espace périplasmique (« outward facing conformation »). Une large cavité permet la fixation des substrats et l'affinité des sites varie selon la conformation du transporteur (Jardetzky, 1966). Les structures cristallographiques de transporteurs ABC entiers confirment l'existence de ces deux conformations (Dawson et *al.*, 2006; Aller et *al.*, 2009) (détaillées plus tard). La fixation et la libération du substrat sont gouvernées par la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, et la libération de l'ADP et du phosphate inorganique. Dans la conformation outward facing, les importateurs fixent le substrat alors que les exportateurs expulsent la molécule hors de la cellule. La libération d'ADP et de phosphate inorganique permet le retour du transporteur dans sa conformation inward facing dans laquelle les importateurs libèrent le substrat dans le cytoplasme alors que les exportateurs en fixent de nouveaux. Ce modèle est compatible à la fois avec le « switch model » (figure 18a) et le « constant contact model » (figure 18b) proposés pour le cycle catalytique d'hydrolyse de l'ATP. En revanche, il propose un mécanisme commun de transport pour les importateurs et les exportateurs ABC (Procko et *al.*, 2009). Or, les nouvelles structures cristallographiques de transporteurs entiers suggèrent un mécanisme différent. Nous verrons plus tard que le mécanisme du cycle de transport suscite encore de nombreuses questions et que sa compréhension globale fait l'objet d'un très vif débat au sein de la communauté scientifique.



## Figure 18 : Les conformations inward et outward facing durant le cycle de transport.

Adapté de Coleman et *al.*, 2013.

**A)** Dans le switch model, la fixation des deux molécules d'ATP induit la dimérisation des NBDs et le passage des TMDs d'une conformation inward à outward facing. **B)** Dans le constant contact model, le passage de la conformation inward vers outward facing nécessite le réarrangement conformationnel des NBDs et la fixation d'une molécule d'ATP dans le site consensus.

### Les structures cristallographiques de transporteurs ABC entiers.

Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel les protéines ABC transportent leur substrat à travers les membranes cellulaires, des données structurales sont essentielles. Les premières ont été obtenues à basse résolution par microscopie électronique pour les transporteurs humains MRP1 ( $\approx 22$  Å) (Rosenberg et *al.*, 2001), CFTR ( $\approx 20$  Å) (Rosenberg et *al.*, 2004), TAP1/TAP2 ( $\approx 35$  Å) (Velarde et *al.*, 2001), la glycoprotéine P de hamster ( $\approx 25$  Å) (Rosenberg et *al.*, 1997) et de souris ( $\approx 22$  Å) (Lee et *al.*, 2002), pour le transporteur bactérien BmrA de *Bacillus subtilis* (Chami et *al.*, 2002) et pour pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae* (Ferreira-Pereira et *al.*, 2003). Ces structures à faible résolution ont permis de confirmer la topologie générale des transporteurs ABC constitués au minimum de deux TMDs (formés chacun par au moins six hélices transmembranaires) et de deux NBDs.

Compte tenu des difficultés que représente la cristallisation des protéines membranaires, il a fallu attendre 2002 pour que la première structure d'un transporteur ABC entier soit déterminée à plus haute résolution par cristallographie aux rayons X : celle du transporteur de la vitamine B<sub>12</sub> BtuCD. Depuis, de nombreuses autres structures tridimensionnelles de transporteurs ABC (BtuCD, HI1470/1, HmuUV, ModBC, MalFGK<sub>2</sub>, MetNI, Sav1866, MsbA, ABCB1, TM287/288, ABCB10, Atm1, McjD et CmABCB1) ont été déterminées à moyenne ou haute résolution. La majorité d'entre eux sont d'origine bactérienne, souvent des demi-transporteurs plus faciles à obtenir en grande quantité. Beaucoup de structures ont été résolues dans une forme apo ou en complexe avec des nucléotides. Six transporteurs ont été obtenus en complexe avec des substrats (MalFGK<sub>2</sub>, ModBC, Atm1 et McjD) ou des inhibiteurs (ABCB1 de souris et de l'algue rouge *Cyanidioschyzon merolae*). Dans cette partie, nous allons procéder à l'inventaire et à la description détaillée de l'ensemble de ces structures. Nous terminerons par une discussion concernant le mécanisme de transport des substrats.

#### a) Les importateurs ABC

A ce jour, six structures d'importateurs ABC ont été résolues, tous sont d'origine procaryote. Les différences structurales observées ont conduit à les classer en deux catégories. La première regroupe l'importateur de maltose, MalFGK<sub>2</sub>, le transporteur de méthionine MetNI et celui de molybdate ModBC d'*Archaeoglobus fulgidus* et *Methanosarcina acetivorans*. La seconde comprend l'importateur de vitamine B<sub>12</sub>, BtuCD, le transporteur de l'hème HmuUV et HI1470/71 de *Haemophilus influenzae*. Les détails concernant l'origine, le code PDB, la résolution et la conformation de ces structures sont résumés dans le tableau 6.

Nom	Organisme	Code PDB	Rés. Å	Etat nucléotidique	Ligand	Con-formation	Ref.
BtuCD	E. coli	1L7V	3.2	V <sub>4</sub> O <sub>12</sub> <sup>4-</sup>	Complexe avec BtuF	OF	Locher 2002
		2QI9	2.6	Apo		IF-O	Hvorup 2007
BtuCD (E159Q)		4DBL	3.49	Apo		IF-O	Korkhov 2012
BtuCD (E159Q, N162C)		4FI3	3.47	AMPPNP-Mg <sup>2+</sup>		IF-C	Korkhov 2012
		4R9U	2.79	AMPPNP-Mg <sup>2+</sup>			Korkhov 2014
HI1470/1	H. influenza	2NQ2	2.4	Apo		IF-O	Pinkett 2007
HmuUV	Y. pestis	4G1U	3.0	Apo		IF-O	Mattle 2010
ModBC	A. fulgidus	2ONK	3.1	Apo		Pre-T	Hollenstein 2007
	M. acetivorans	3D31	3.5	Apo		IF-O	Gerber 2008
MalFGK <sub>2</sub>	E. coli	2R6G	2.8	ATP	Complexe avec MBP	OF	Oldham 2007
		3FH6	4.5	Apo		IF	Khare 2009
		3PV0	3.1	Apo	Complexe avec MBP maltose	Pre-T	Oldham 2011
		3PUY	3.1	AMPPNP			
		3PUZ	2.9	AMPPNP			
		3RLF	2.2	Mg-AMPPNP	Complexe avec MBP maltose	OF	Oldham 2011
		3PUX	2.3	ADP-BeF <sub>3</sub>			
		3PUV	2.4	ADP-VO <sub>4</sub>			
		3PUW	2.3	ADP-AlF <sub>4</sub>			
		4JBW	3.9	EIIA <sup>Glc</sup>		IF	Chen 2013
		4KHZ	2.9	Apo	MBP-maltoheptose	Pre-T	Oldham 2013
		4KIO	2.4	Mg-AMPPNP	MBP-maltohexose	OF	
MetNI	E. coli	3DHW	3.7	Apo			Kadaba 2008
		3TUI	2.9	ADP			
		3TUJ	4.0	Apo		IF-O	Johnson 2012
		3TUZ	3.4		Selenium méthionine		

Art(QN) <sub>2</sub>	<i>T. tengcongensis</i>	4YMS	2.8	Apo		IF	Yu 2015
		4YMT	2.6	Apo	Arginine	IF	
		4YMU	2.5	ATP-Mg <sup>2+</sup>	Arginine	IF-SO	
		4YMV	3.0	ATP-Mg <sup>2+</sup>		IF-SO	
		4YMW	2.8	Apo	Histidine	IF	

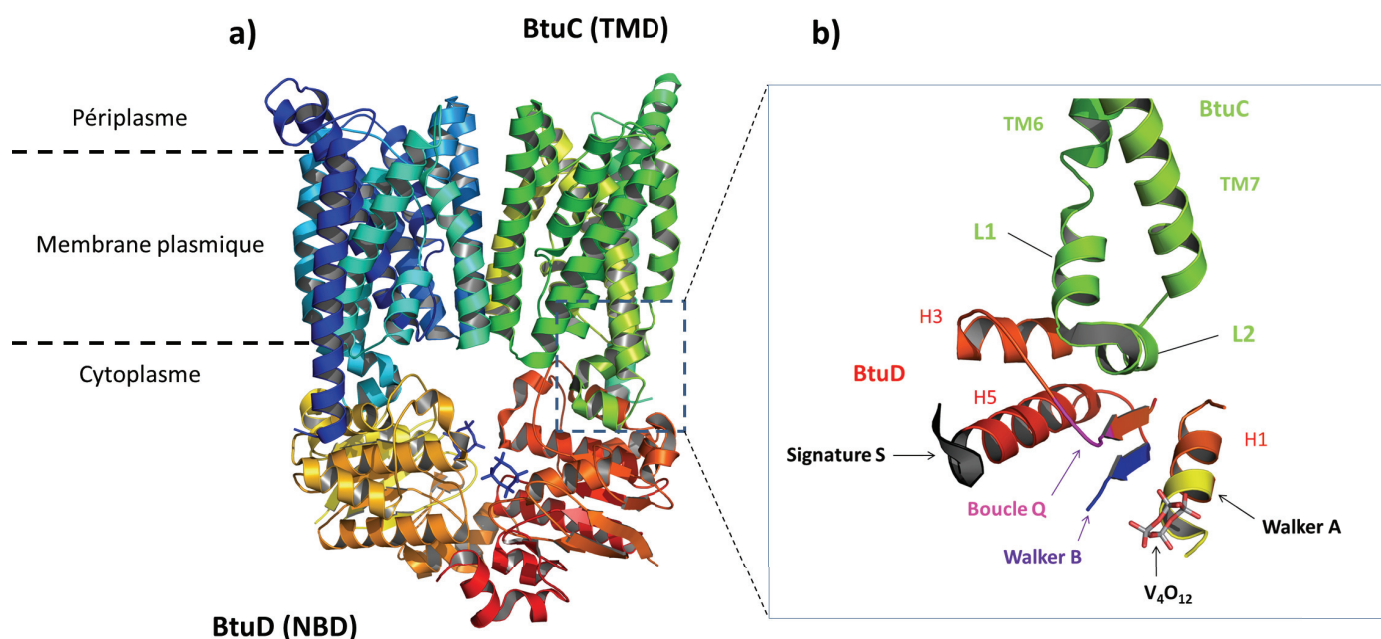
**Tableau 6. Les structures cristallographiques d'importateurs ABC.**

Les importateurs de type I sont colorés en jaune et de type II en saumon.

(1) Les importateurs de type II

(a) L'importateur de vitamine B<sub>12</sub>, BtuCD

Le premier transporteur ABC à avoir été cristallisé est l'importateur de vitamine B<sub>12</sub> BtuCD d'*Escherichia coli* en complexe avec une molécule de cyclo-tétra-vanadate (V<sub>4</sub>O<sub>12</sub><sup>4-</sup>) dans les deux sites de fixation de l'ATP (PDB : 1L7V, 3.2 Å) (Locher et *al.*, 2002). BtuCD est un hétérodimère formé par l'assemblage de deux domaines transmembranaires (BtuC) et deux domaines cytoplasmiques (BtuD). La vitamine B<sub>12</sub> est reconnue et apportée du côté extracellulaire du transporteur par la protéine périplasmique BtuF (Cadieux et *al.*, 2002). BtuCD adopte une conformation outward facing (figure 19a) avec les NBDs associés dans une conformation tête-bêche, similaire à celle de Rad50. Une molécule de cyclo-tétra-vanadate est située à l'interface des motifs A et B de Walker d'un NBD et de la signature S de l'autre. Le vanadate monomérique (VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) est habituellement utilisé pour inhiber l'activité des transporteurs ABC. Après hydrolyse de l'ATP, il se substitue au phosphate γ et bloque le transporteur dans un état post-hydrolytique (ADP+ VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Le cyclo-tétra-vanadate est présent dans cette structure car il constitue l'espèce majoritaire de vanadate au pH utilisé pour la croissance des cristaux de BtuCD (Heath et *al.*, 1981). Les cartes de densité électronique obtenues à partir des cristaux avec et sans vanadate montrent que le cyclo-tétra-vanadate ne modifie pas la structure du transporteur. La conformation outward facing de BtuCD-V<sub>4</sub>O<sub>12</sub><sup>4-</sup> représente donc une forme apo, c'est-à-dire obtenue en absence de nucléotides.



**Figure 19 : Structure cristallographique de BtuCD- $V_4O_{12}^{4-}$  (1L7V, 2002) et interface entre les domaines TMD et NBD.**

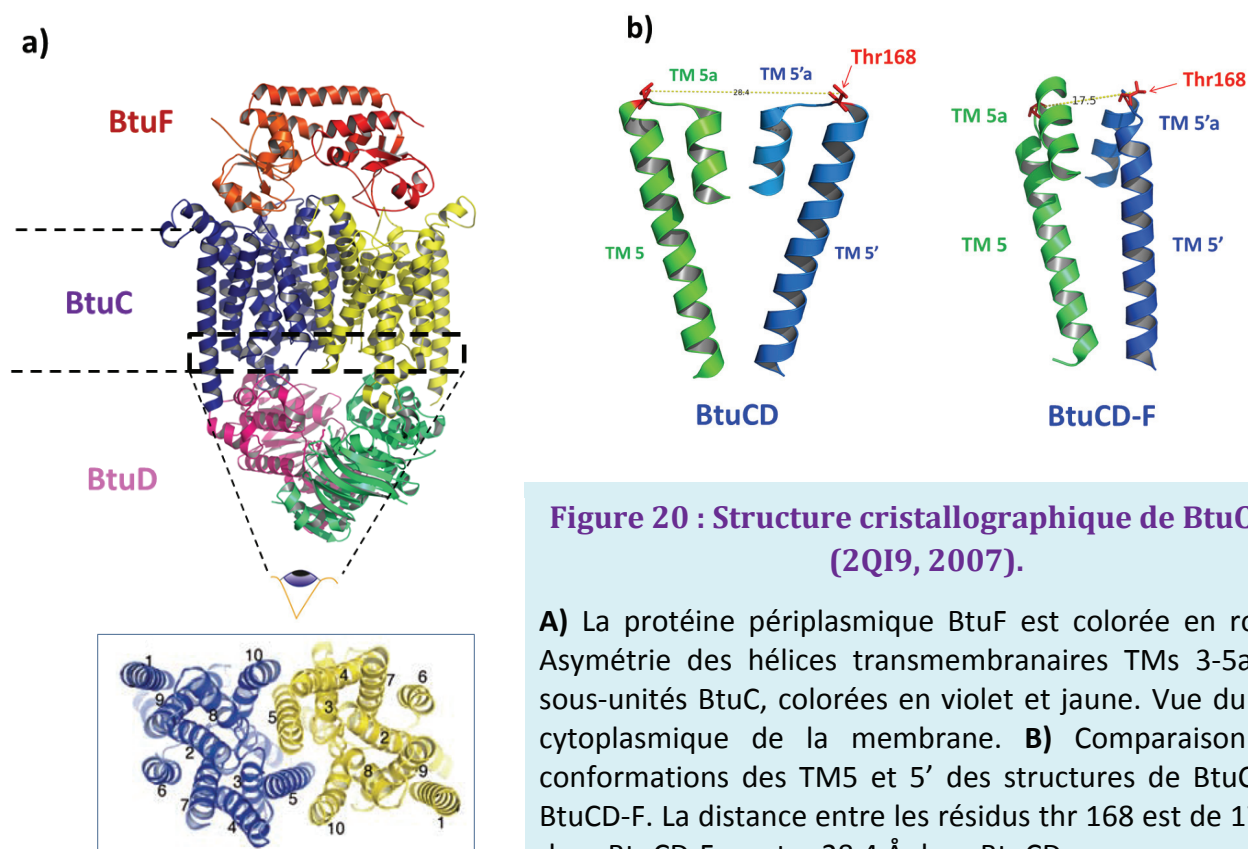
**A)** BtuCD est composé de deux TMDs (BtuC) colorés en bleu et vert, et deux NBDs (BtuD) colorés en rouge et orange. **B)** Interaction entre la boucle L, formée par les hélices L1 et L2 (en vert) et la boucle Q (en magenta).

La superposition de la structure de BtuCD- $V_4O_{12}^{4-}$  avec celles de HisP, Rad50 et MJ0796 obtenues en complexe avec des nucléotides montre que le cyclo-tétra-vanadate occupe la position des phosphates  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ATP. Les deux sous-unités BtuC contiennent chacune dix hélices transmembranaires et forment une cavité ouverte vers l'espace périplasmique et fermée du côté cytoplasmique par les résidus Thr 142 et Ser 143, situés dans la boucle reliant les TMs 4 et 5 (appelée « gate I ») de chaque sous-unité BtuC. L'intérieur de la cavité est bordé de résidus hydrophobes (TMs 5-10-3 et 8).

BtuC et BtuD interagissent par le biais d'une boucle cytoplasmique qui relie les hélices TM6 et TM7 et formée par deux petites hélices  $\alpha$  coudées en forme de « L » (boucle L) (figure 19b). Cette boucle interagit avec les résidus de la boucle Q de BtuD et joue un rôle dans la transmission des changements conformationnels des NBDs aux TMDs et vice-versa.

Cinq ans plus tard, le même groupe parvient à obtenir la structure de BtuCD en absence de nucléotides et liée à sa protéine périplasmique BtuF en absence de vitamine B<sub>12</sub> (figure 20) (PDB : 2QI9, 2.6 Å) (Hvorup et al., 2007). BtuCD-F présente des changements conformationnels importants par rapport aux structures de BtuCD et BtuF obtenues isolément. Les deux lobes de BtuF sont écartés de 4 Å de plus par rapport à la structure de BtuF en complexe avec la vitamine B<sub>12</sub> (PDB : 1N4A) (Karpowich et al., 2003) et chaque lobe contacte une sous-unité BtuC (figure 20a).





L'interface BtuC<sub>2</sub>-BtuF est composée de liaisons ioniques entre les résidus Arg 56 (BtuC) et Glu 74/202 (BtuF). La mutation E74A empêche la formation du complexe BtuCD-F. Les boucles extracellulaires qui relient les hélices TM5 et TM5a des sous-unités BtuC s'insèrent dans le site de fixation de la vitamine B<sub>12</sub> de BtuF, ce qui a probablement entraîné sa libération lors du processus de cristallisation.

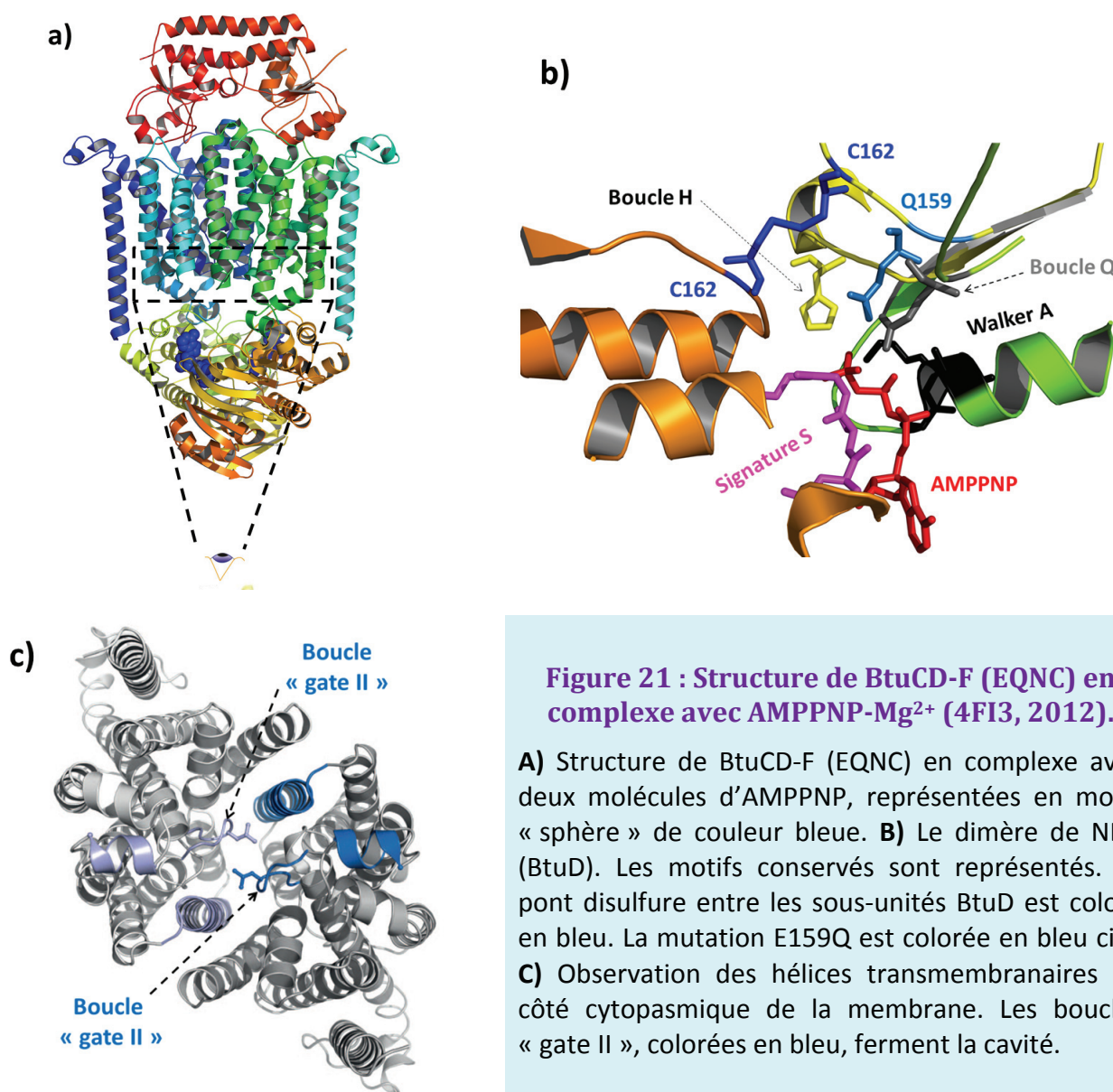
La particularité de cette structure concerne l'asymétrie des hélices transmembranaires TMs 3, 4, 5 et 5a des deux sous unités BtuC (figure 20a). Elles adoptent deux conformations différentes, ce qui rend la cavité centrale inaccessible des deux côtés de la membrane. La pertinence physiologique de cette conformation a été confirmée par des études de résonance paramagnétique électronique (EPR) réalisées sur BtuCD et BtuCD-F reconstitués en protéoliposomes. La distance entre les résidus thréonine 168 (situés dans la boucle extracellulaire qui relie les TMs 5 et 5a) des deux sous-unités BtuC passe de 14 Å dans BtuCD-F à plus de 25 Å dans BtuCD. Ces valeurs sont bien en accord avec les structures cristallographiques dans lesquelles les distances sont respectivement de 17.5 et 28.4 Å (voir figure 20b).

En 2012, Locher réussit au prix de nombreux efforts à obtenir la structure de BtuCD-F en complexe avec l'AMPPNP (figure 21a) (PDB: 4FI3, 3.47 Å) (Korkhov et al, 2012). Après avoir introduit une première mutation dans le motif Walker B (E159Q) pour arrêter la réaction d'hydrolyse de l'ATP, la cristallisation de BtuCD-F (E159Q) en présence d'AMPPNP-Mg<sup>2+</sup> a abouti à la cristallisation d'une forme apo sans nucléotides (PDB : 4DBL, 3.49 Å) (Korkhov



et *al.*, 2012). Dans toutes les structures de dimères de NBDs résolues en complexe avec l'ATP, les résidus de la boucle D des sous-unités BtuD se trouvent en contact étroit (Smith et *al.*, 2002; Hopfner et *al.*, 2000). Une seconde mutation a donc été introduite dans la boucle D (N162C) pour permettre la formation d'un pont disulfure entre les deux sous-unités BtuD et ainsi stabiliser la protéine dans une conformation qui fixe l'ATP. Ce double mutant, baptisé BtuCD-F (EQNC), a permis d'obtenir la structure en complexe avec deux molécules d'AMPPNP-Mg<sup>2+</sup> (figure 21b).

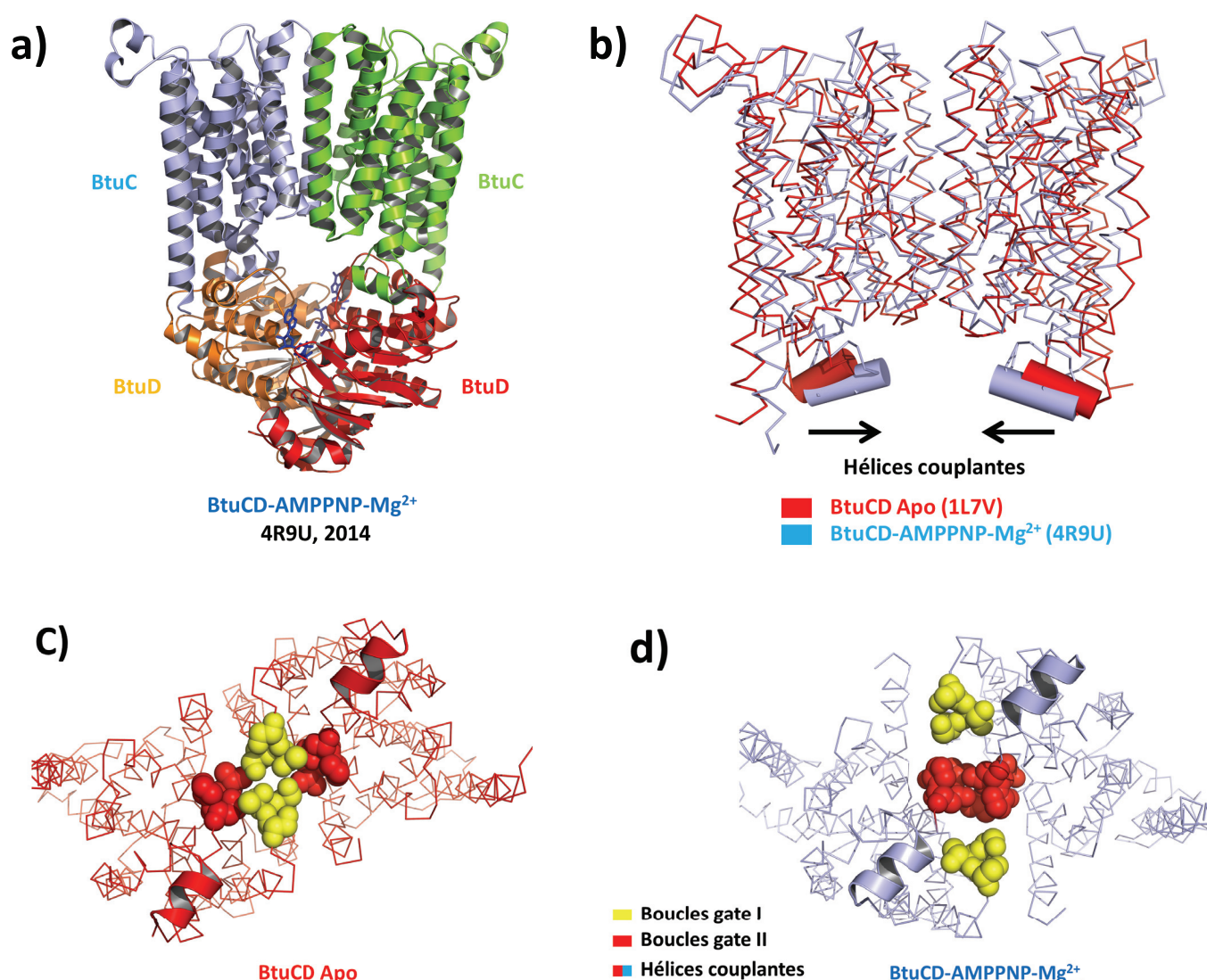
Comme attendu, les NBDs forment un dimère fermé avec les deux sites de liaison à l'ATP situés à l'interface des sous-unités BtuD. La fixation d'AMPPNP induit une nouvelle conformation au niveau des TMDs, avec la formation d'une cavité centrale entièrement fermée, du côté périplasmique par les hélices TMs 5a et 5'a, et du côté cytoplasmique par une boucle appelée « gate II » qui connecte les TMs 2 et 3 (figure 21c).



Cette cavité est suffisamment grande pour pouvoir accueillir une molécule de vitamine B<sub>12</sub> mais des expériences d'EPR réalisées sur BtuCD-F en détergent montrent une grande flexibilité au niveau des boucles reliant les TMs 4-5 et 2-3 (Goetz et *al.*, 2009; Joseph et *al.*, 2011), ce qui expliquerait pourquoi il est si difficile d'obtenir la structure de BtuCD-F en complexe avec la vitamine B<sub>12</sub>.

Korkhov et ses collaborateurs ont néanmoins montré qu'il est essentiel que BtuCD soit dans une conformation outward facing pour que la vitamine B<sub>12</sub> se fixe à l'intérieur de la cavité de translocation. En effet, BtuCD sauvage, reconstitué en protéoliposomes, fixe la cyanocobalamine, une forme synthétique de la provitamine B12 (marquée pour cette expérience avec du cobalt 57), seulement en présence d'AMPPNP-Mg<sup>2+</sup> alors que le double mutant BtuCD (EQNC) l'incorpore à la fois en absence et en présence de nucléotides (dans des quantités deux fois plus importantes).

En 2014, Locher obtient la structure de BtuCD (EQNC) en complexe avec l'AMPPNP et en absence de la protéine périplasmique BtuF (PDB : 4R9U, 2.79 Å) (Korkhov et *al.*, 2014) (figure 22a). Les hélices couplantes de BtuC se rapprochent l'une de l'autre par rapport aux structures de BtuCD apo et BtuCD-F (figure 22b). La voie de translocation est fermée du côté cytoplasmique par les boucles gate II (figure 22d). Contrairement à BtuCD-F-AMPPNP qui est fermée des deux côtés de la membrane, BtuCD-AMPPNP adopte une conformation outward facing. La conformation de ses hélices transmembranaires est identique à celles de BtuCD-F-AMPPNP du côté cytoplasmique et à celles de BtuCD apo du côté périplasmique.

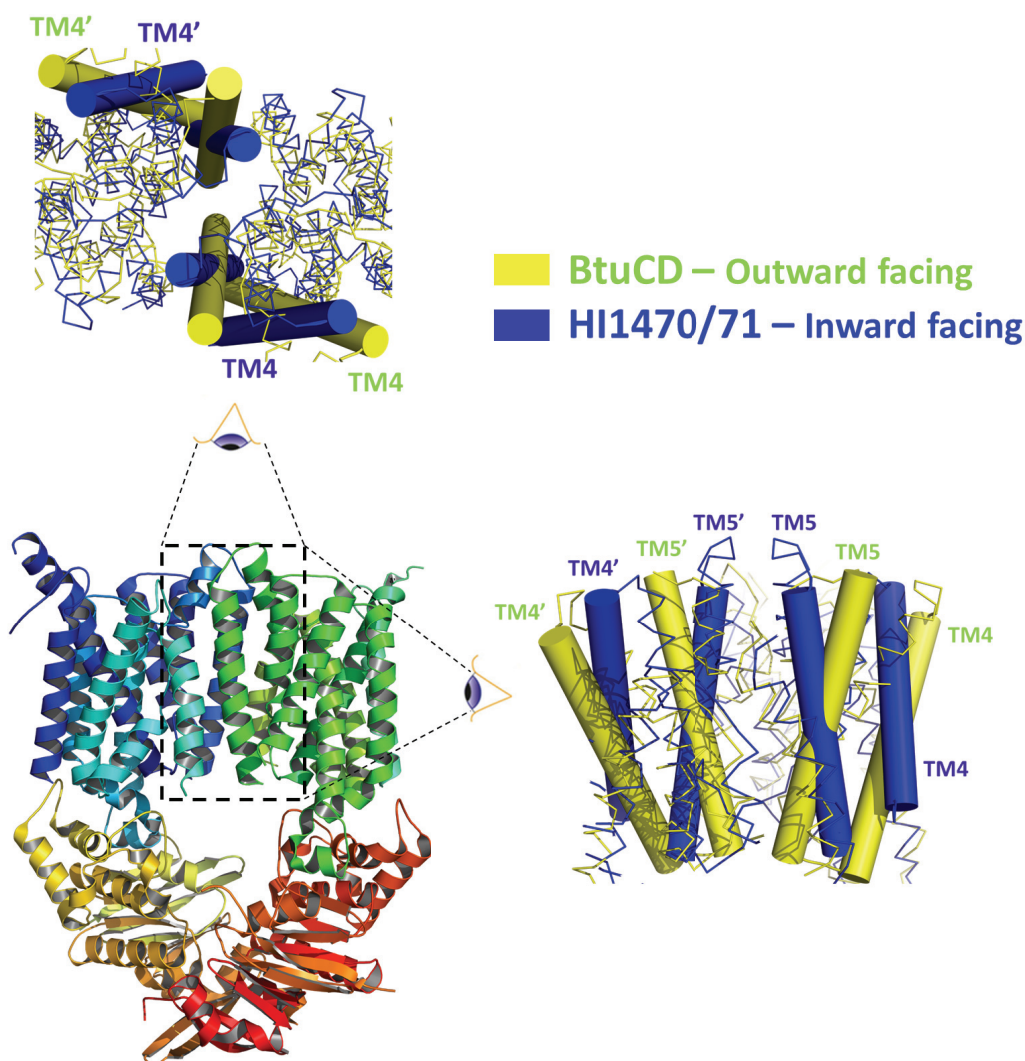


**Figure 22 : Structure cristallographique de BtuCD (EQNC) en complexe avec AMPPNP-Mg<sup>2+</sup> (4R9U, 2014).**

**A)** Les sous-unités BtuC sont colorées en bleu et vert et les sous-unités BtuD en rouge et orange. **B)** Comparaison de BtuCD-apo (PDB : 1L7V) et BtuCD<sub>EQNC</sub>-AMPPNP-Mg<sup>2+</sup> (PDB : 4R9U), le déplacement des hélices couplantes est indiqué par une flèche noire. **C et D)** Vue du côté cytoplasmique de la membrane de BtuCD apo et BtuCD<sub>EQNC</sub>-AMPPNP-Mg<sup>2+</sup>, les résidus 141-143 formant la boucle gate I et 83-85 formant la boucle gate II sont représentés en mode sphère et colorés respectivement en jaune et rouge.

## (b) 'importateur HI1470/1

HI1470/1 est un transporteur ABC chez la bactérie *Haemophilus influenzae* impliqué dans l'import de molybdate (Tirado-Lee et *al.*, 2011). Il est composé de deux domaines transmembranaires (HI1471) et deux domaines cytoplasmiques (HI1470) qui partagent respectivement 24 et 33 % d'identité de séquence avec les sous-unités BtuD et BtuC. Sa structure a été résolue en 2007 en absence de nucléotides (figure 23) (PDB : 2NQ2, 2.4 Å) (Pinkett et *al.*, 2007).



**Figure 23 : Structure cristallographique de HI1470/1 (2NQ2, 2007) et superposition avec BtuCD des TMs 4 et 5 (1L7V, 2002).**

Au centre, La structure du transporteur HI1470/1 est composée de deux TMDs (HI1470) en bleu et vert et deux NBDs (HI1471) en orange et rouge. En haut et à droite, superposition des TMs 4 et 5 de HI1470 (bleu) avec ceux de BtuCD (jaune).

Les structures de HI1470/1 et BtuCD sont relativement proches avec un RMSD de 2.4 Å sur l'ensemble des résidus. Contrairement à BtuCD qui présente une conformation outward facing, HI1470/1 adopte une forme inward facing. La disposition de sept hélices



transmembranaires (TM1, 2, 6 à 10) est identique entre les deux structures alors que trois autres (TM3, 4 et 5) diffèrent de façon significative. Le réarrangement le plus important concerne l'hélice TM5, qui subit une rotation de 20°, ce qui entraîne la fermeture de la voie de translocation du côté périplasmique et son ouverture vers l'espace cytoplasmique (figure 23). Au niveau des domaines nucléotidiques, Hl1470/71 adopte une conformation semi-ouverte avec une distance de 16 Å entre la boucle P et la signature ABC des deux NBDs (contre 14 Å dans BtuCD).

La parution de la structure de Hl1470/71 a complètement remis en cause l'existence physiologique de la conformation outward facing de BtuCD obtenue en absence de nucléotides. Il a longtemps été admis que les transporteurs ABC adoptaient un mécanisme de transport commun étant donné la forte conservation structurale de leurs NBDs. Le fait que BtuCD ne soit plus dans son environnement membranaire mais en présence de détergent pourrait avoir déplacé l'équilibre conformationnel de la protéine vers une forme non physiologique (Pinkett et *al.*, 2007). Mais en 2009, des études de résonance paramagnétique électronique ont montré que le mécanisme de couplage des importateurs ABC de type II était différent (Goetz et *al.*, 2009; Joseph et *al.*, 2011). En 2012, la structure du transporteur ABC HmuUV a permis de valider la pertinence physiologique de la conformation outward facing de BtuCD apo.

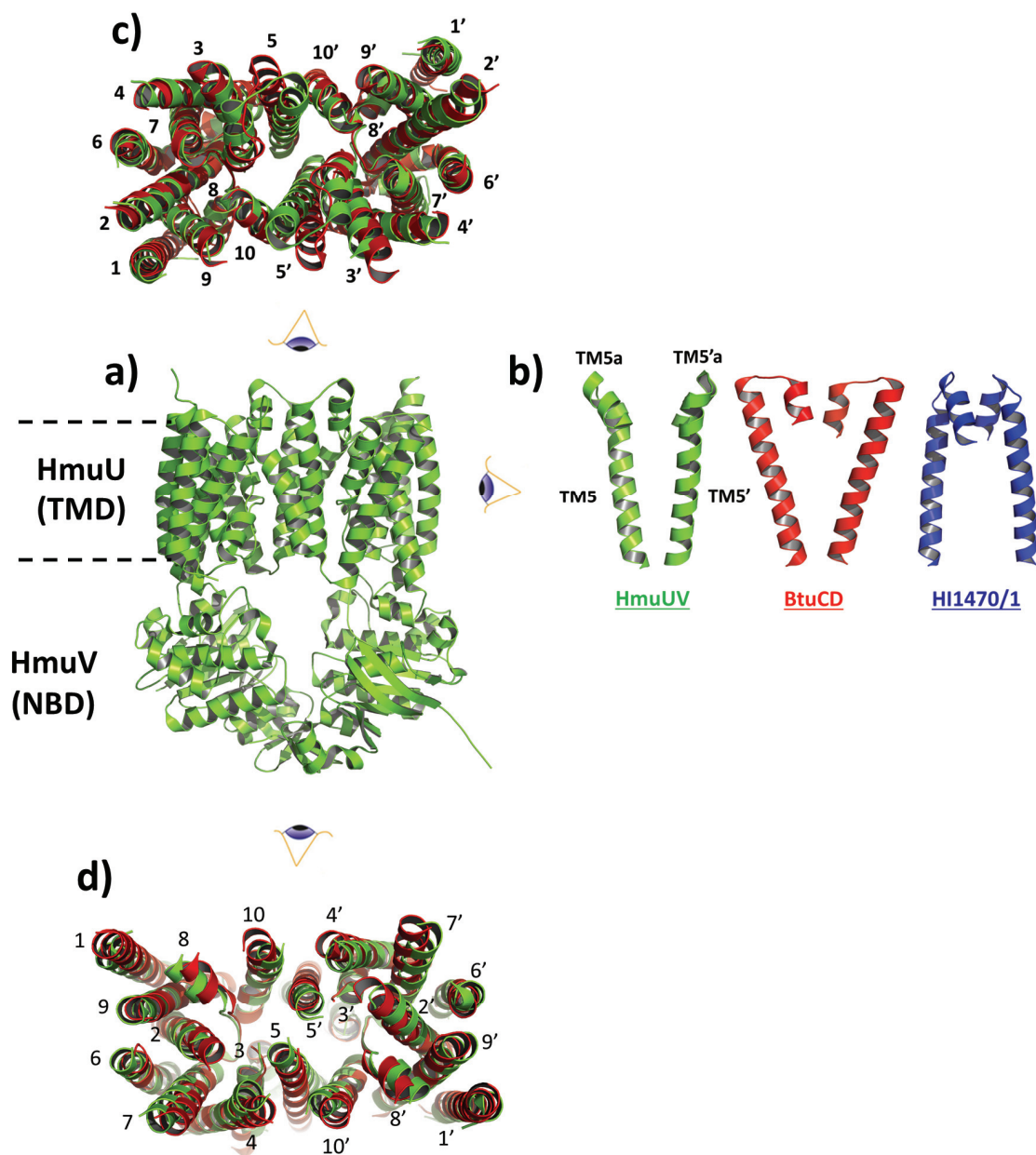
### (c) HmuUV

L'hème constitue une source importante de fer pour la bactérie pathogène *Yersinia pestis*. HmuUV est un importateur ABC (de type II) hétérotétramérique composé de deux domaines transmembranaires (HmuU) et deux domaines nucléotidiques (HmuV). La structure de sa protéine périplasmique HmuT a été résolue en 2010 en complexe avec deux molécules d'hème (PDB : 3MD9, 1.5 Å) (Mattle et *al.*, 2010). En 2012, le groupe de Locher a déterminé celle de HmuUV dans la forme apo (PDB : 4G1U, 3.0 Å) (Woo et *al.*, 2012) (figure 24a).

La structure de HmuUV est en accord avec celle de BtuCD qui adopte en absence de nucléotides une conformation outward facing (figure 24 c-d). Les sous-unités HmuU/BtuC et HmuV/BtuD partagent respectivement 37 et 28 % d'identité de séquence. La superposition de leurs structures montre qu'au niveau de la voie de translocation, l'entrée périplasmique est plus petite dans HmuUV que dans BtuCD. Cette différence est probablement liée à la taille de leurs substrats (1 355 Da pour la cobalamine contre 652 Da pour l'hème). Les résidus Arg 176 et Gly 164, situés à l'entrée périplasmique des sous-unités HmuU, sont impliqués dans la reconnaissance de la sous unité HmuT. La mutation de Arg 176 en alanine réduit de 75 % la formation du complexe HmuUV-T et le transport de l'hème est réduit de 85 % avec le mutant HmuUV G164Y. Au niveau cytoplasmique, les sous-unités HmuV adoptent une conformation semi-ouverte avec une importante séparation entre le Walker A et la signature S.

Les structures de HmuUV et BtuCD sont en contradiction (figure 24b) avec celles de l'importateur ABC de type I, MalFGK<sub>2</sub>, obtenu dans une conformation inward facing dans la forme apo et outward facing en complexe avec des nucléotides. Ces différences conforma-

tionnelles confirment que le mécanisme de transport des substrats est bien différent entre les importateurs de type I et II.



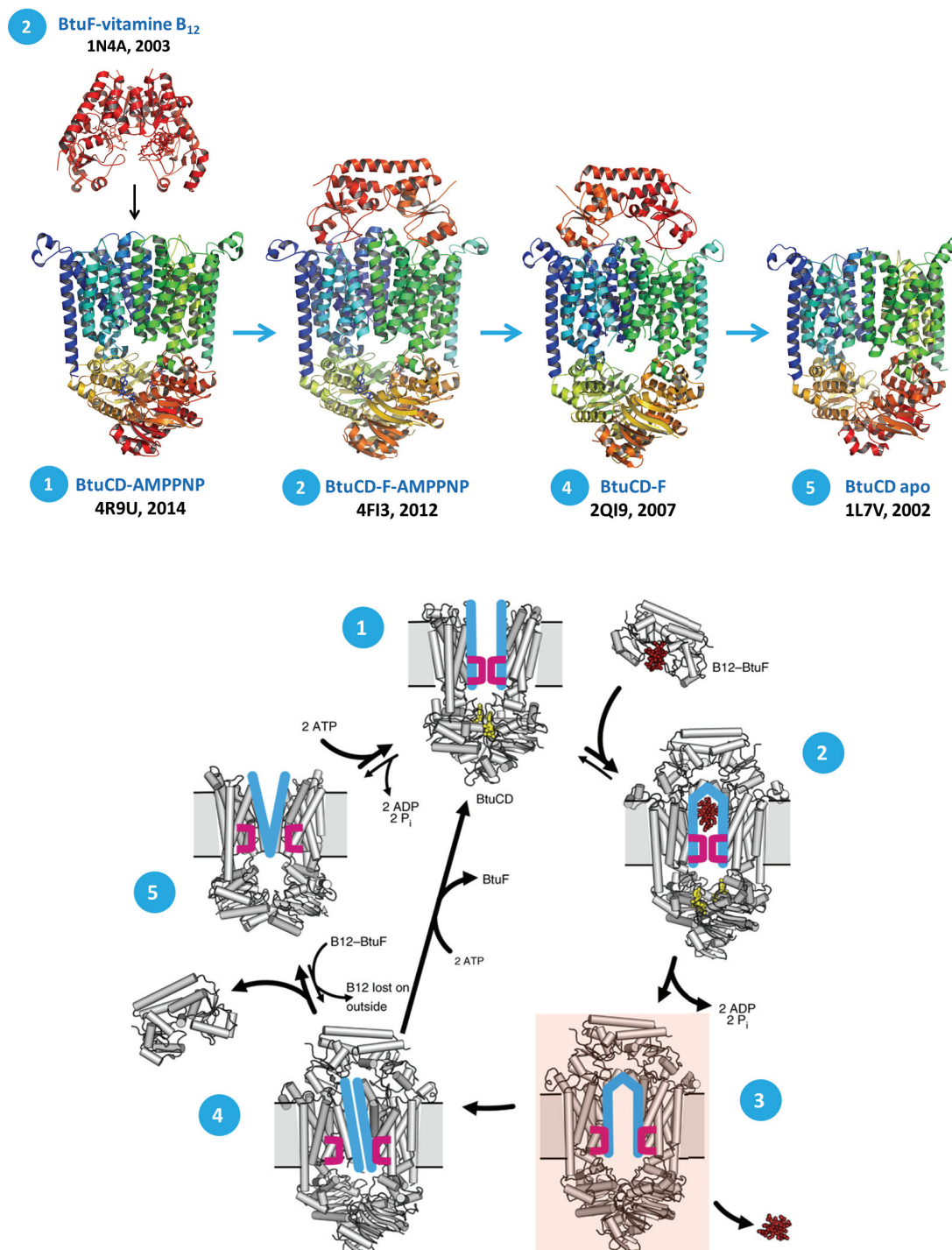
**Figure 24 : Structure cristallographique de HmuUV (4G1U, 2012) et superposition avec BtuCD (1L7V, 2002).**

**A)** La structure du transporteur ABC HmuUV est composée de deux TMDs (HmuU) et deux NBDs (HmuV). **B)** Conformation des hélices transmembranaires TM5 et 5a de HmuUV, BtuCD et HI1470/1. HmuUV et BtuCD présentent une conformation outward facing alors qu'HI1470/71 adopte une forme inward facing. **C)** Superposition des hélices transmembranaires de HmuUV et BtuCD. Vue du côté périplasmique de la membrane. **D)** Vue cette fois-ci du côté cytoplasmique de la membrane.

#### (d) Le mécanisme de transport

Les structures cristallographiques de BtuCD ont permis d'en déduire le mécanisme de transport des importateurs de type II (figure 25 ci-après). En absence de nucléotides, les NBDs sont dans une conformation semi-ouverte et les TMDs forment une cavité fermée du côté cytoplasmique et ouverte vers l'espace périplasmique. La fixation de l'ATP induit la fermeture du dimère de NBDs, entraînant la fermeture des boucles cytoplasmiques gate II et l'ouverture des boucles gate I (état 1). La fixation de la protéine périplasmique BtuF en complexe avec la vitamine B<sub>12</sub> sur BtuCD bascule le transporteur dans une conformation fermée de chaque côté de la membrane (état 2). L'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate inorganique induit l'ouverture des hélices couplantes et des boucles cytoplasmiques gate II. La conformation inward facing permet la libération de la vitamine B12 dans l'espace cytoplasmique (états 3 et 4). La dissociation de BtuF induit la fermeture des boucles cytoplasmiques gate I et l'ouverture des TMDs vers l'espace périplasmique (état 5).





**Figure 25 : Le mécanisme de transport des importateurs de type II.**

Adapté de Korkhov et *al.*, 2014.

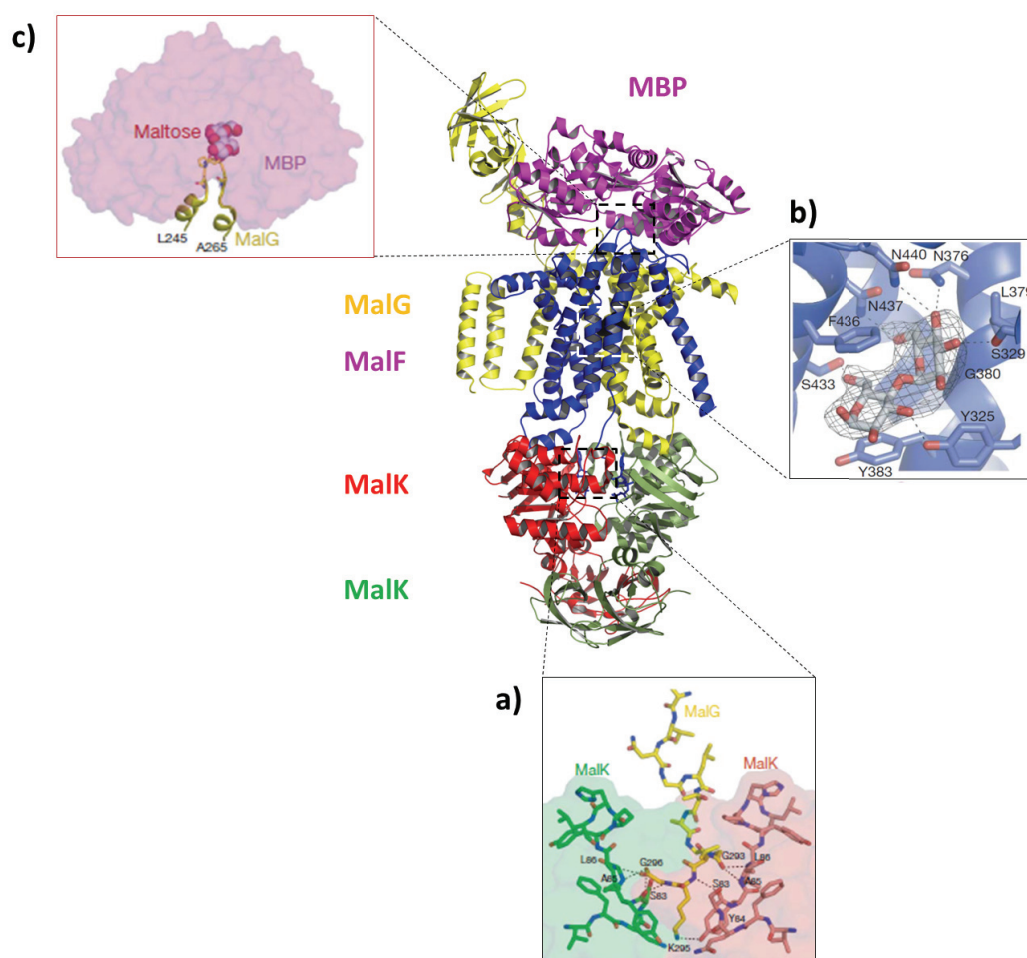
Les structures de BtuCD sont colorées en gris. Les chiffres colorés en bleu sont discutés dans le texte. Les nucléotides et la vitamine B<sub>12</sub> sont colorés respectivement en jaune et rouge. Les traits bleus représentent l'hélice transmembranaire TM5 des sous-unités BtuC et les boucles périplasmiques gate I. Les crochets en magenta représentent les boucles gate II. Pi : phosphate inorganique.

## (2) Les importateurs de type I

### (a) L'importateur de maltose, MalFGK<sub>2</sub>

MalFGK<sub>2</sub> est un importateur de maltose chez la bactérie *Escherichia coli*. La première de ses structures a été résolue en 2007 en complexe avec sa protéine périplasmique (MalE), une molécule de maltose et deux d'ATP (figure 26) (PDB : 2R6G, 2.8 Å) (Oldham et al., 2007). MalFGK<sub>2</sub> est un hétérodimère formé par l'assemblage de deux sous-unités transmembranaires (MalF et MalG) et cytoplasmiques (MalK<sub>2</sub>). Pour stabiliser et cristalliser le complexe MalE-MalFGK<sub>2</sub>-ATP, l'acide glutamique du motif Walker B a été muté en glutamine (E159Q) dans le site de fixation de l'ATP. Cette mutation augmente de 10<sup>4</sup> fois l'affinité des NBDs entre eux et bloque l'hydrolyse de l'ATP.

Les sous-unités MalK (E159Q) forment un dimère fermé avec deux molécules d'ATP fixées à l'interface. La structure est identique à celle du dimère MalK<sub>2</sub> sauvage résolue en complexe avec l'ATP (PDB : 1Q12, 2.6 Å) (RMSD de 0.6 Å sur les C<sub>α</sub> de 740 résidus). L'extrémité C-terminale de MalG s'insère à l'intérieur du dimère MalK<sub>2</sub> (figure 26a). Elle stabilise la boucle Q en établissant trois liaisons Hydrogène avec les résidus S83, A85, et L86 de chaque sous-unité MalK.



**Figure 26 : Structure cristallographique de MBP-MalFGK<sub>2</sub>-ATP (2R6G, 2007).**

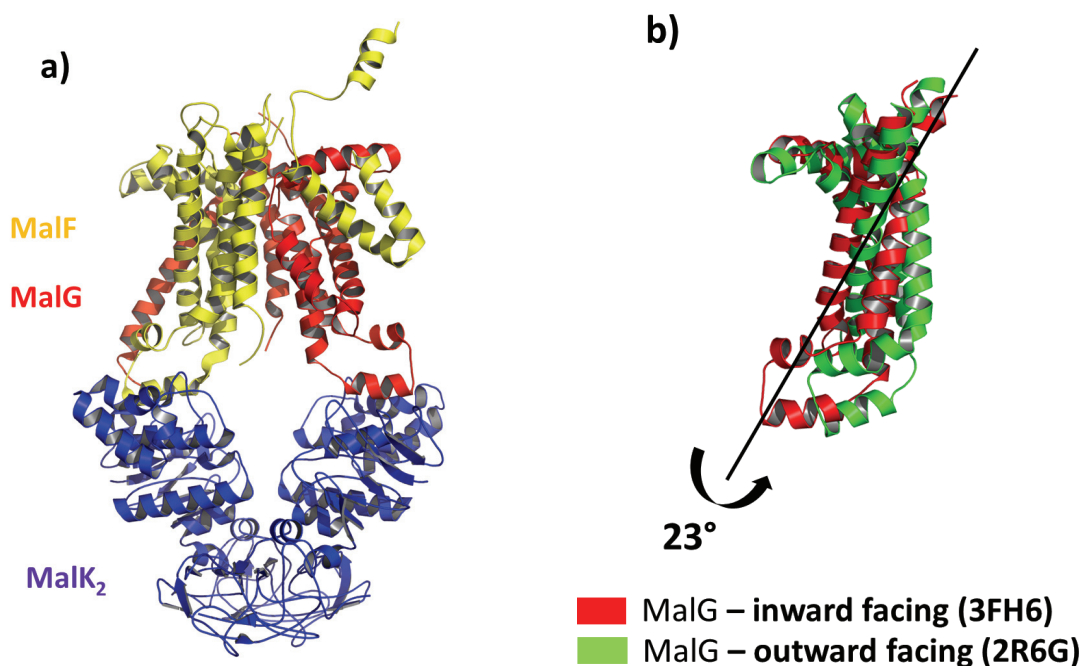
Adapté de Oldham et al., 2007.

A) L'extrémité C-terminale de MalG (jaune) s'insère dans le dimère de MalK<sub>2</sub> (rouge et vert).  
 B) Une molécule de maltose est représentée entre les deux TMDs au milieu de la bicouche lipidique.  
 C) La boucle P3 de MalG s'insère dans le site de fixation du maltose de MalE.

MalF et MalG sont composés respectivement de huit et six hélices transmembranaires, disposées dans une conformation outward facing. Des études d'EPR ont montré que la fixation simultanée d'AMPPNP et de MalE étaient nécessaires pour obtenir MalFGK<sub>2</sub> dans une conformation outward facing (Orelle et *al.*, 2010). Malgré le fait que les hélices TMs 3-8 de MalF et 1-6 de MalG ne partagent que 13 % d'identité de séquence, elles sont symétriques, reliées par une rotation de 180°. Une molécule de maltose se situe à l'interface des deux domaines transmembranaires au milieu de la bicouche lipidique (figure 26b), à l'intérieur d'une cavité de 6,500 Å<sup>3</sup> fermée du côté périplasmique par MalE et cytoplasmique par les hélices transmembranaires. Des résidus aromatiques (Y325, F436) et des ponts salins (S329, N376, L379, G380, S433, N437 et N440) sont impliqués dans la reconnaissance du maltose. En revanche, aucun résidu de MalG n'interagit avec la molécule de sucre.

MalE est dans une conformation ouverte et interagit avec la boucle P3 (qui relie les TMs 5 et 6) de MalG et P2 (qui relie les TMs 3 et 4) de MalF. P3 s'insère à l'intérieur du site de fixation du maltose de MalE (figure 26c), ce qui permet de déloger la molécule de maltose et faciliter son transfert vers la voie de translocation.

Deux ans plus tard, l'équipe de Chen obtient la structure de MalFGK<sub>2</sub> dans une conformation inward facing en absence de la protéine périplasmique MalE et de nucléotides (figure 27a) (PDB : 3FH6, 4.5 Å) (Khare et *al.*, 2009).



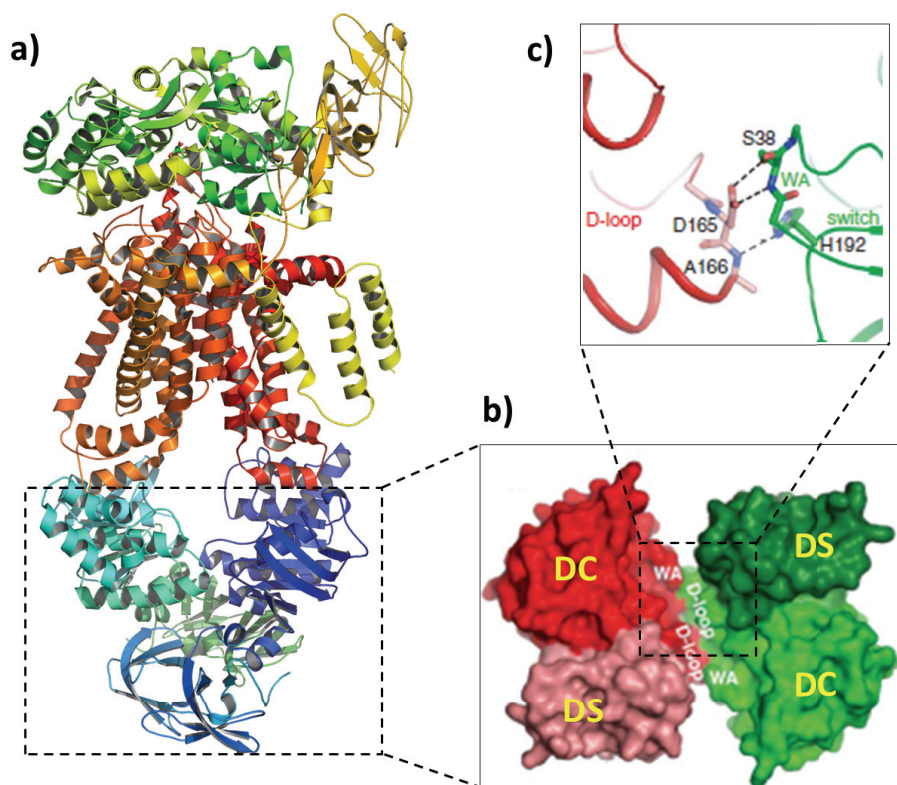
**Figure 27 : Structure cristallographique de MalFGK<sub>2</sub> apo (3FH6, 2009).**

**A)** Les sous-unités MalK sont colorées en bleu, MalF en jaune et MalG en rouge. **B)** Superposition des sous-unités MalG des structures de MalFGK<sub>2</sub> apo (3FH6) et MalFGK<sub>2</sub>-ATP (2R6G).

La superposition des structures de MalFGK<sub>2</sub> avec et sans nucléotides montre que le passage de la conformation inward à outward facing s'effectue via une rotation de 23° des hélices transmembranaires suivie d'une translation de 4 Å autour d'un axe incliné de 45° par rapport au plan de la membrane (figure 27b). Les domaines MalF et MalG se séparent dans le feuillet interne et le site de fixation du maltose est accessible depuis le cytoplasme. La boucle P et la signature S des NBDs sont séparés par une distance de 20 Å, compatible avec des mesures réalisées par EPR (Orelle et *al.*, 2008). La conformation inward facing représente l'état de repos du transporteur dit « resting state », dans lequel l'activité ATPasique basale est faible (Davidson et *al.*, 1992).

Oldham et Chen ont résolu en 2011 la structure de MalFGK<sub>2</sub> apo en complexe avec la protéine périplasmique MalE (G69C/S337C) (figure 28a) (PDB : 3PV0, 3.1 Å) (Oldham et Chen, 2011). Les deux cystéines du mutant MalE (G69C/S337C) forment un pont disulfure qui permet de mimer la conformation fermée liée au maltose. La fixation de MalE sur MalFGK<sub>2</sub> induit une conformation semi-ouverte des NBDs. Les boucles D se retrouvent à l'interface du dimère MalK<sub>2</sub> (figure 28b) avec les résidus conservés D165 et A166 qui établissent des liaisons hydrogènes avec S38 (Walker A) et H192 (région switch) de la sous unité opposée (figure 28c).

Des études d'EPR réalisées sur MalFGK<sub>2</sub> en solution en détergent indiquent qu'en présence de MalE, l'ajout d'AMPPNP induit la conformation outward facing (Orelle et *al.*, 2008). MalFGK<sub>2</sub>-MBP représente un état dit de pré-translocation entre les formes inward et outward facing. La fixation de l'ATP induit ensuite la dimérisation des NBDs et bascule le transporteur vers la conformation outward facing.



**Figure 28 : Structure cristallographique de MalFGK<sub>2</sub>-MBP (3PV0, 2011).**

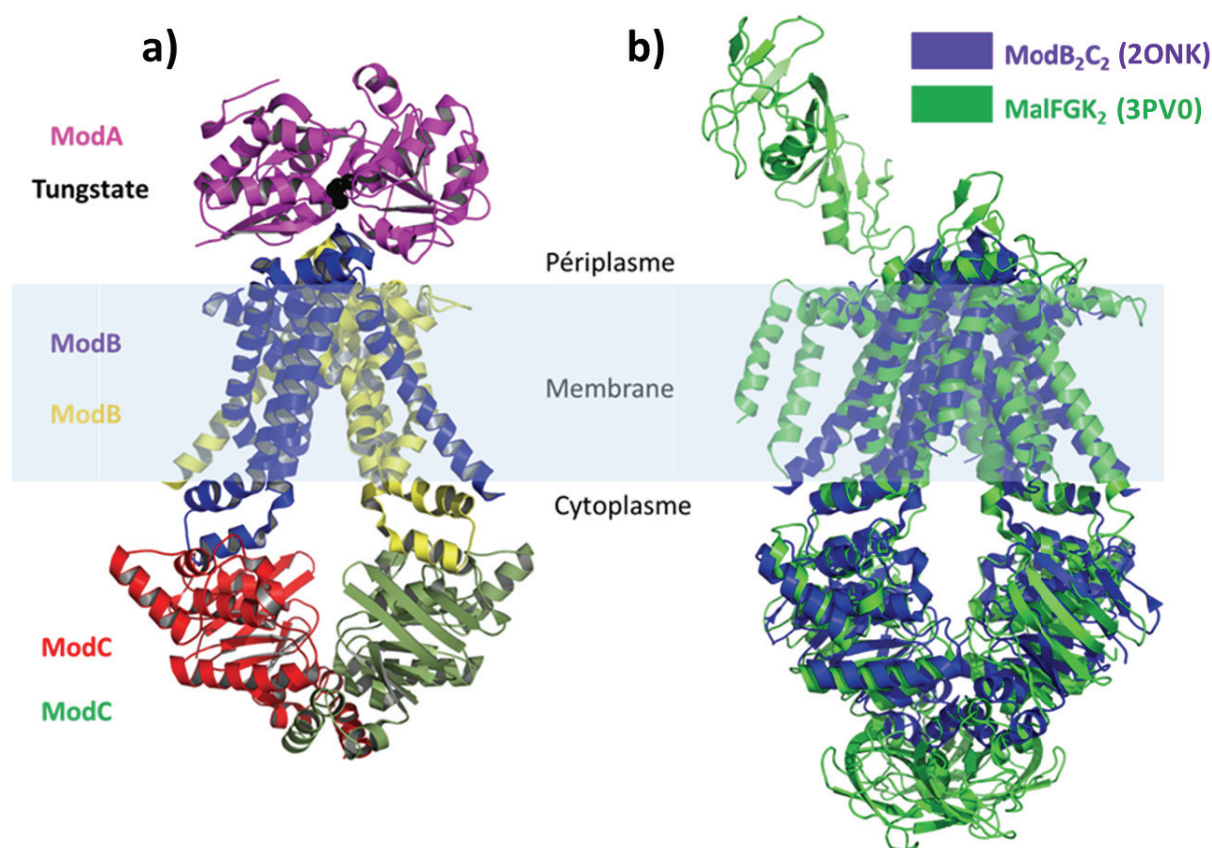
Adapté d'Oldham et Chen, 2011.

**A)** Structure de MalFGK<sub>2</sub> apo en complexe avec la protéine MBP. **B)** Représentation en surface des domaines de fixation des nucléotides. Les domaines catalytiques et de signalisations sont indiqués par les lettres DC et DS. WA : Walker A. **C)** Interactions entre la boucle D et le Walker A.

#### (b) L'importateur de molybdate et de tungstate, ModB<sub>2</sub>C<sub>2</sub>

En 2007, l'équipe de Locher a déterminé la structure de l'importateur de molybdate et de tungstate ModB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> de l'archée hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* en complexe avec sa protéine périplasmique (ModA) (PDB : 2ONK, 3.1 Å) (Hollenstein et al., 2007) (figure 29a). ModB<sub>2</sub>C<sub>2</sub>A représente un état de pré-translocation avec les domaines transmembranaires (ModB<sub>2</sub>) dans une conformation inward facing et les NBDs (ModC<sub>2</sub>) semi-ouverts. Malgré le fait que ModB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> et MalFGK<sub>2</sub> ne partagent que 8 % d'identité de séquence, leurs structures sont proches avec un RMSD de 4 Å sur les Cα de l'ensemble des résidus (figure 29b). ModA se fixe sur ModB<sub>2</sub> dans une orientation qui place le site de fixation du substrat juste au-dessus de l'entrée de la cavité de translocation. Les deux lobes de ModA interagissent avec les boucles extracellulaires (qui relient les TMs 3-4 et 5-6) de ModB.





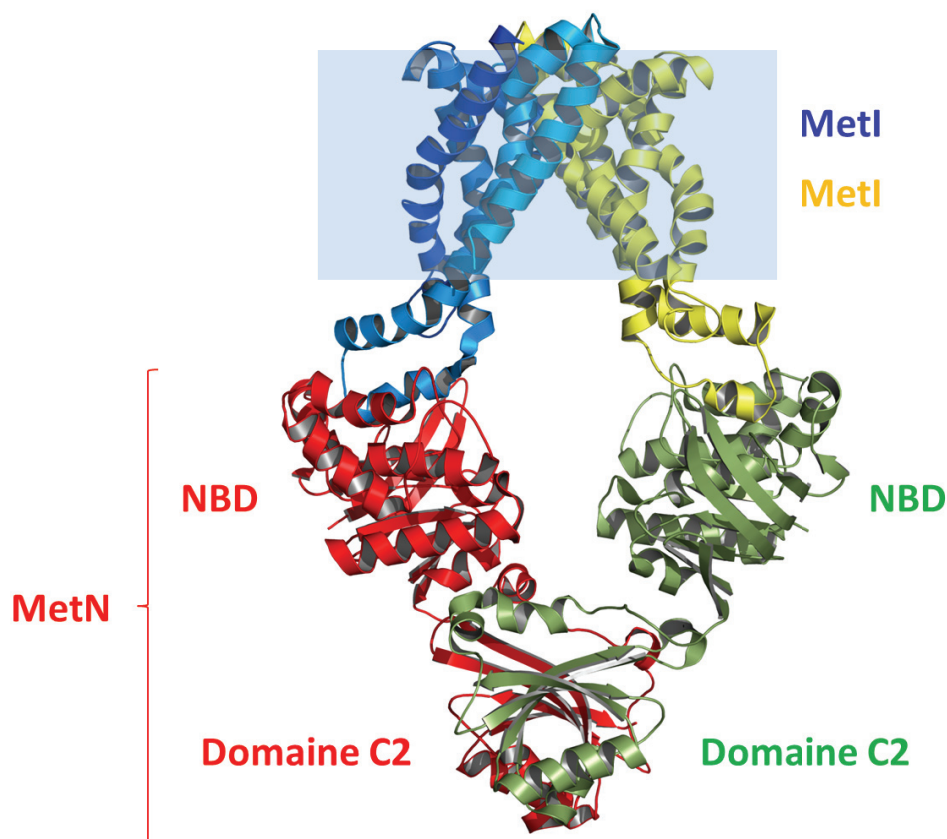
**Figure 29 : Structure cristallographique de ModB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> (2ONK, 2007).**

Adapté de Hollenstein et al., 2007.

A) Les domaines transmembranaires (ModB<sub>2</sub>) sont colorés en bleu et jaune et les domaines cytoplasmiques (ModC<sub>2</sub>) en rouge et vert. La protéine SBP (ModA) est colorée en magenta. B) Superposition de ModB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> (bleu) et de MalFGK<sub>2</sub> (vert). RMSD de 4 Å sur les Cα de l'ensemble des résidus.

### (c) L'importateur de méthionine, MetNI

MetNI catalyse l'import de D- et L-méthionine chez la bactérie *Escherichia coli*. Ce transporteur est composé de deux domaines transmembranaires (MetI) et cytoplasmiques (MetN). Chaque sous-unité MetI est composée de cinq hélices transmembranaires. Sa structure a été résolue dans une conformation inward facing en absence de nucléotides (PDB : 3DHW, 3.7 Å) (Kadaba et al, 2008.) (figure 30). Elle est similaire à celles des transporteurs de molybdate ModB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> et de maltose MalFGK<sub>2</sub>. La particularité de MetNI est de posséder un domaine C-terminal supplémentaire C2 (résidus 265-343) qui régule son activité. En 1977, Kadner démontra que l'accumulation intracellulaire de méthionine inhibe l'activité de transport de MetNI. Ce mécanisme de régulation appelé trans-inhibition se met en place lorsque suffisamment de méthionine est présente à l'intérieur de la bactérie dans le but d'éviter de consommer inutilement de l'ATP. La fixation de la méthionine sur le domaine C2 maintient les NBDs séparés dans une conformation inward facing, ce qui inhibe l'hydrolyse de l'ATP et bloque le cycle de transport.



**Figure 30 : Structure cristallographique du transporteur MetNI (3DHW, 2008).**

Adapté de Kadaba et *al.*, 2008.

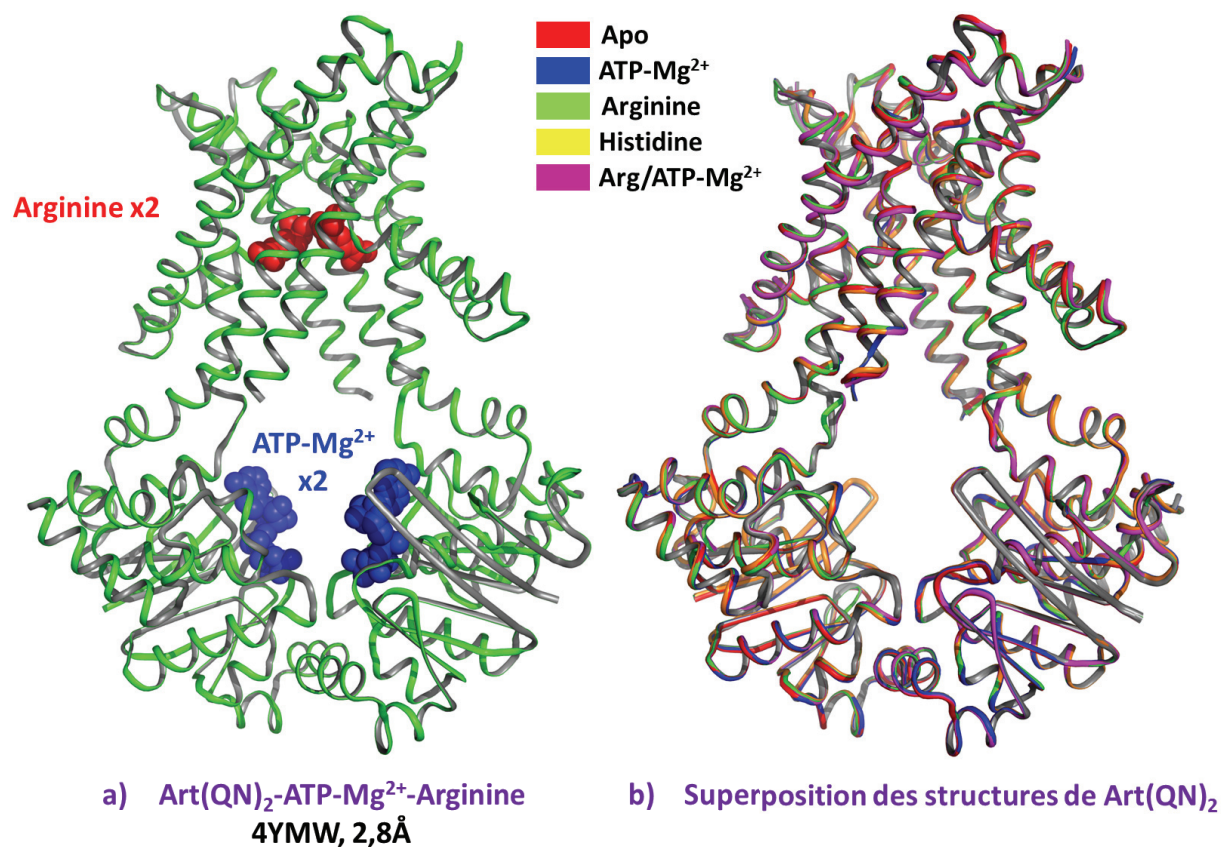
Les domaines transmembranaires MetI sont colorés en bleu et jaune et les domaines cytoplasmiques MetN en rouge et vert. Un domaine C2 supplémentaire est présent en position C-terminale.

#### (d) L'importateur de résidus chargés positivement, Art(QN)<sub>2</sub>

La dernière structure d'un transporteur ABC à avoir été résolue en 2015 est celle de l'importateur d'acides aminés chargés positivement, Art(QN)<sub>2</sub> de la bactérie thermophile *T. tengcongensis* (Yu et *al.*, 2015). Il a été obtenu dans cinq formes différentes : en absence (4YMS, 2.8 Å) et présence d'ATP-Mg<sup>2+</sup> (4YMV, 3.0 Å), en complexe avec deux résidus arginine (4YMT, 2.6 Å) ou histidine (4YMW, 2.8 Å) puis en présence simultanément d'arginine et ATP-Mg<sup>2+</sup> (4YMU, 2.5 Å) (figure 31a). Art(QN)<sub>2</sub> est un homodimère composé de deux TMDs (ArtQ) et deux NBDs (ArtN). Les cinq structures sont toutes identiques avec un RMSD de seulement 0.2 Å (figure 31b). Elles adoptent une conformation inward facing avec les TMDs séparés et les NBDs semi-ouverts. Au milieu de la bicouche lipidique, chaque domaine transmembranaire possède une poche composée de résidus chargés négativement (principalement aspartate et glutamate) qui permettent la fixation d'acides aminés comme l'arginine ou l'histidine chargés positivement (figure 31a). Le fait qu'aucun changement conformationnel ne soit observé entre les cinq structures est dû à l'absence de la protéine SBP dont la fixation lors du cycle de transport est critique pour induire le passage de la forme inward à outward



facing. Mais malheureusement Li et ses collaborateurs ne sont pas parvenus à obtenir les structures de Art(QN)<sub>2</sub> en complexe avec ArtI.

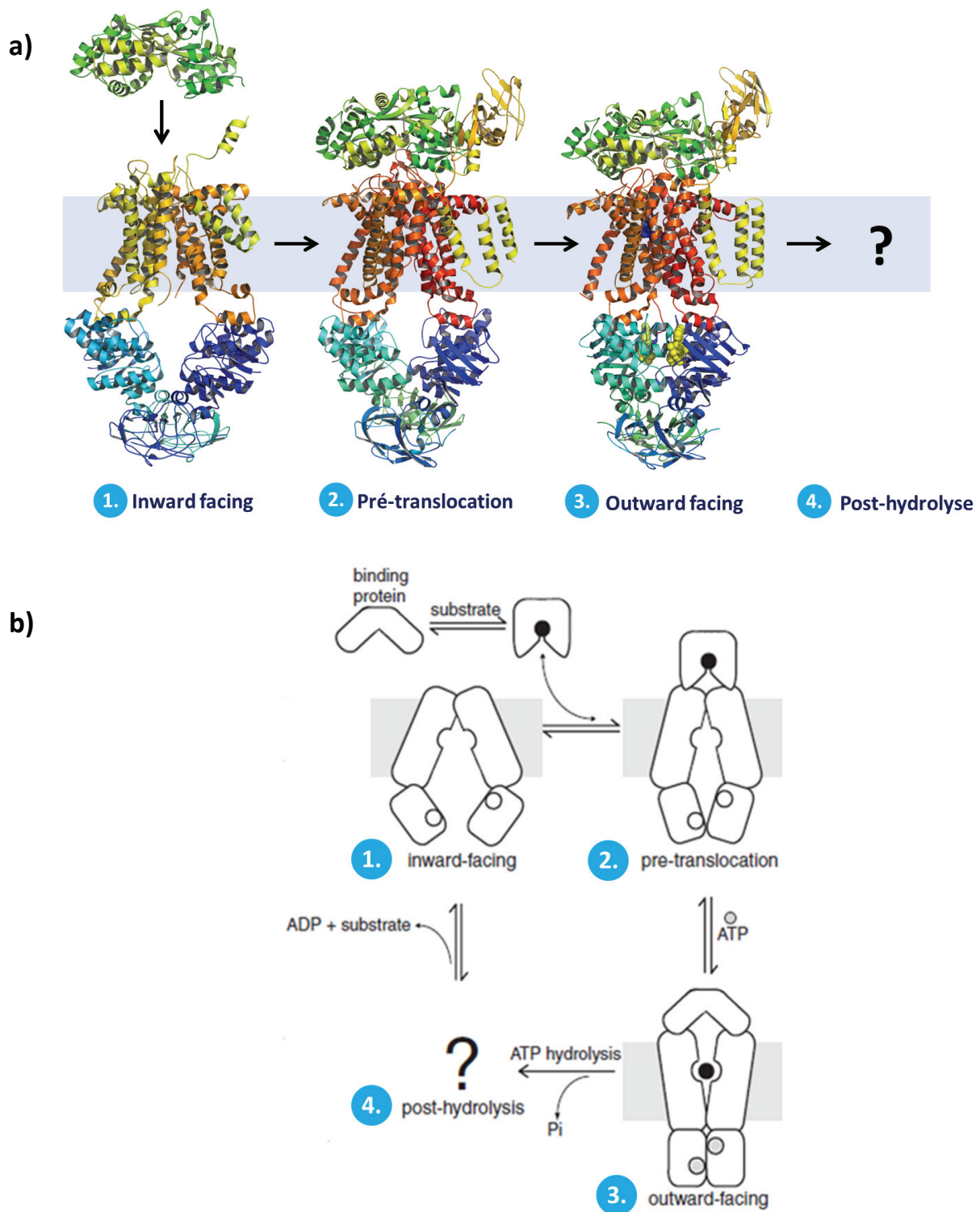


**Figure 31 : Les structures cristallographiques de Art(QN)<sub>2</sub>.**

A) Les molécules d'arginine et d'ATP-Mg<sup>2+</sup> sont représentées en mode sphère et colorées respectivement en rouge et bleu. B) Superposition de toutes les structures de Art(QN)<sub>2</sub>.

### (e) Le mécanisme de transport

Les structures de MalFGK<sub>2</sub> ont permis d'en déduire le mécanisme de transport des importateurs de type I (figure 32a-b). En absence de nucléotides, les NBDs sont séparés et les TMDs forment une cavité fermée du côté périplasmique et ouverte sur le cytoplasme. La fixation de la protéine MalE induit des changements conformationnels au niveau des TMDs et NBDs. Les NBDs se retrouvent dans une conformation semi-ouverte (état de pré-translocation) et la fixation de deux molécules d'ATP induit leur dimérisation. Dans cette conformation, la cavité est fermée du côté cytoplasmique par les TMDs et du côté périplasmique par MalE. Cette dernière se trouve dans une conformation ouverte et libère une molécule de maltose qui se fixe au niveau d'un site spécifique de MalF. L'hydrolyse de l'ATP ne semble pas modifier cette conformation mais la libération de l'ADP et du phosphate inorganique permet le retour du transporteur dans sa conformation initiale. Ce mécanisme, basé sur les structures cristallographiques, est en accord avec plusieurs études biochimiques et notamment d'EPR (Chen, 2013; Bohm et *al.*, 2013; Jacso et *al.*, 2012; Bordignon et *al.*, 2010).



**Figure 32 : Le mécanisme de transport des importateurs de type I.**

**A)** Exemplifié à partir des structures de MalFGK<sub>2</sub>. **B)** Représentation schématique. Codes PDB : 3FH6 (inward facing), 3PV0 (Pré-translocation), 2R6G (outward facing).

## b) Les exportateurs ABC

A ce jour, huit structures d'exportateurs ABC ont été résolues, deux sont d'origine eucaryote et six procaryotes. Les détails concernant l'origine, le code PDB, la résolution et la conformation de ces structures sont résumés dans le tableau 7 ci-dessous :

Nom	Organisme	Code PDB	Rés. Å	Etat nucléotidique	Ligand	Conf.	Ref.
Sav1866	<i>S. aureus</i>	2HYD	3	ADP		OF	Dawson 2006
		2ONJ	3.4	AMPPNP		OF	Dawson 2007
MsbA	<i>E. coli</i>	3B5W	5.3	Apo		IF-O	Ward 2007
	<i>V. cholerae</i>	3B5X	5.5	Apo		IF-F	
	<i>S. typhimurium</i>	3B5Z	4.2	ADP-VO <sub>4</sub>		OF	
		355Y	4.5	AMPPNP		OF	
		3B60	3.7			OF	
ABCB1 (P-gp)	<i>Mus musculus</i>	3G5U	3.8	Apo			Aller 2009
		3G60	4.4	Apo	QZ59-RRR	IF-O	
		3G61	4.35	Apo	QZ59-SSS		
	<i>C. elegans</i>	4F4C	3.4	Apo		IF-O	Jin 2012
	<i>Mus musculus</i>	4KSB	3.8	Apo			Ward 2013
		4KSC	4.0	Apo		IF-O	
		4KSD	4.1	Nb592 sur NBD1			
	<i>M. musculus</i> 2009 corrigées	4M1M	3.8	Apo			Li 2014
		4M2S	4.4	Apo	QZ59-RRR	IF-O	
		4M2T	4.35	Apo	QZ59-SSS		
TM287/288	<i>Thermotoga maritima</i>	3QF4	2.9	AMPPNP		IF-O	Hohl, 2012
		4Q4H	2.53	Apo			Hohl 2014
		4Q4J	3.2	Apo		IF-O	
		4Q4A	2.6	AMPPNP			
ABCB10	<i>Homo sapiens</i>	4AYT	2.85	AMPPCP			Shintre 2013
		4AYX	2.9	AMPPCP			
		4AYW	3.3	AMPPNP		IF-O	
		3ZDQ	2.85	Apo			
Atm1	<i>N. aromati-civorans</i>	4MRN	2.5	Apo			Lee 2014
		4MRP	2.5	Apo	GSH	IF-O	

		4MRR	2.97	Apo	SeMet		
		4MRS	2.35	Apo	GSSG		
		4MRV	2.5	Apo	GS-Hg		
	<i>S. cerevisiae</i>	4MYC	3.06	Apo		IF-O	Srinivasan 2014
		4MYH	3.38	Apo	Glutathion		
<b>McjD</b>	<i>E. coli</i>	4PLO	2.7	AMPPNP		IF-F	Choudhury 2014
		3WMG	2.4	Apo	aCAP	IF-O	
<b>CmABCB1</b>	<i>C. merolae</i>	3WME	2.75	Apo		IF-O	Kodan 2014
		3WMF	2.6	Apo		IF-O	

**Tableau 7. Les structures cristallographiques d'exportateurs ABC.**

PDB : Protein data bank, Apo : absence de nucléotide, ADP: adenosine-5'-diphosphate, AMPPNP : Adénosine 5'-( $\beta$ ,  $\gamma$  - imido)triphosphate, AMPPCP:  $\beta$ - $\gamma$ -methyleneadenoside 5'-triphosphate, Conf. : conformation, OF : outward facing, IF-O : inward facing ouvert, IF-F : inward facing fermé, Rés. : résolution, Ref. : référence.

#### (1) Sav1866 de *Staphylococcus aureus*

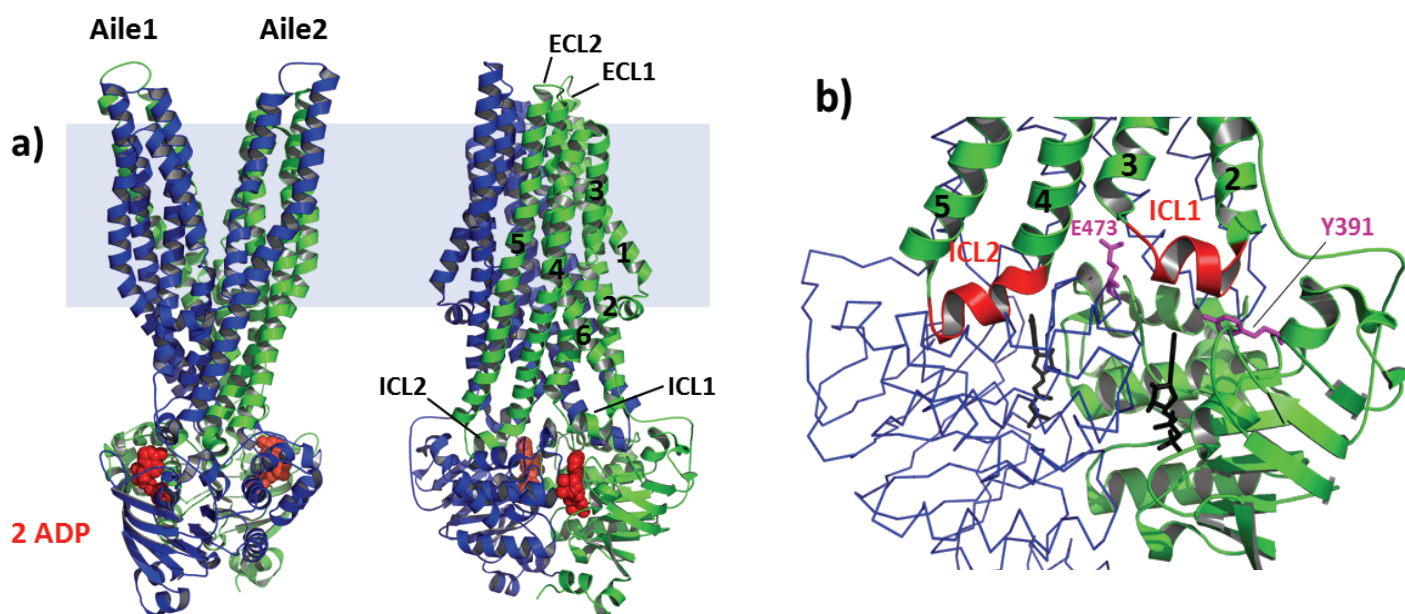
La première structure tridimensionnelle à haute résolution d'un exportateur ABC à avoir été résolue est celle de Sav1866 chez *Staphylococcus aureus* (PDB : 2HYD, 3.0 Å) (Dawson et Locher, 2006). Il a été cristallisé en présence de deux molécules d'ADP situées entre la P-loop et la signature ABC des deux NBDs (figure 33a).

Sav1866 est composé de douze passages transmembranaires. Les hélices  $\alpha$  forment deux ailes séparées l'une de l'autre vers l'extérieur de la cellule (conformation outward facing). Les TMDs ne sont pas individuels car chaque aile est constituée des hélices TM1 et 2 d'un monomère et des hélices TM3 à 6 de l'autre. La conformation de ces hélices est cohérente avec des études menées sur Mdr1 par microscopie électronique (Rosenberg et al., 2005) et par réticulation covalente entre cystéines (Stenham et al., 2003).

Les TMDs sont reliés par de longues boucles extracellulaires (ECLs) et de courtes boucles intracellulaires (ICLs) orientées parallèlement à la membrane. Les boucles ICL1 et ICL2, qualifiées d'« hélices couplantes », jouent un rôle mécanistique majeur dans l'interaction avec les NBDs (figure 33b). ICL1 entre en contact avec les NBDs des deux sous-unités alors qu'ICL2 contacte seulement celui de la sous-unité opposée. L'architecture de ces boucles est conservée chez les exportateurs ABC comme en témoigne la forte similarité de séquence dans cette région entre Sav1866, MsbA, LmrA, YvcC, TAP1, TAP2 et Mdr1. Les ICLs entrent en contact avec les résidus de la boucle Q et deux autres résidus conservés : la tyrosine 391 et l'acide glutamique 473. Ce dernier interagit avec les deux ICLs et appartient à un motif très conservé TEVGERG (nommé « x-loop ») qui précède la signature ABC chez les exportateurs. La x-loop détecte la fixation et l'hydrolyse de l'ATP pour ensuite transmettre les changements conformationnels aux ICLs. Ce motif est absent chez les importateurs ABC, ce

qui confirme bien un mécanisme différent de celui des exportateurs.

La pertinence physiologique de la structure de Sav1866 en complexe avec l'ADP est restée controversée car des données biochimiques indiquent que l'absence du phosphate  $\gamma$  de l'ATP déstabilise le dimère de NBDs. Ces critiques ont conduit Dawson et Locher à cristalliser l'année suivante Sav1866 en complexe avec l'AMPPNP (PDB : 2ONJ, 3.4 Å). La superposition des structures de Sav1866 en complexe avec l'ADP et l'AMPPNP confirme qu'elles sont identiques (rmsd de 0.097 Å sur 1116 résidus). L'ADP est suffisant pour induire un état ATP lié.



**Figure 33 : Structure cristallographique de Sav1866-ADP (2HYD, 2006).**

A) Chaque aile est constituée des TMs 1 et 2 d'une sous-unité et des TMs 3-6 de l'autre. Les molécules d'ADP sont colorées en rouge. Les boucles extra- (ECLs) et intracellulaires (ICLs) sont indiquées. B) Observation de l'interface NBD/TMD. Les hélices couplantes sont colorées en rouge, les molécules d'ADP en noir et les résidus conservés E473/Y391 en magenta.

(2) MsbA

(a) La polémique

La parution de la structure de Sav1866 a permis d'invalider en décembre 2006 les structures de MsbA publiées par G. Chang entre 2001 et 2005. MsbA est un exportateur bactérien qui transporte le lipide A du feuillet cytoplasmique vers le feuillet périplasmique de la membrane interne au cours de la synthèse du lipopolysaccharide des bactéries Gram-négatives.

MsbA de trois espèces bactériennes différentes : *Escherichia coli* (Chang et Roth, 2001), *Vibrio cholerae* (Chang, 2003) et *Salmonella typhimurium* (Reyes et Chang, 2005) avaient été cristallisés. La superposition de Sav1866 avec MsbA de *S. typhimurium* montre une conformation très différente des hélices transmembranaires. Dawson et Locher montrèrent qu'en superposant les structures de Sav1866 et MsbA inversée, on parvenait à une as-



sez bonne superposition des domaines transmembranaires mais l'attribution et l'orientation de ces hélices restaient néanmoins différentes. L'erreur cristallographique conduisant à l'inversion des trois structures de MsbA s'était produite dans le traitement des données (Miller 2006 ; Jeffrey 2009).

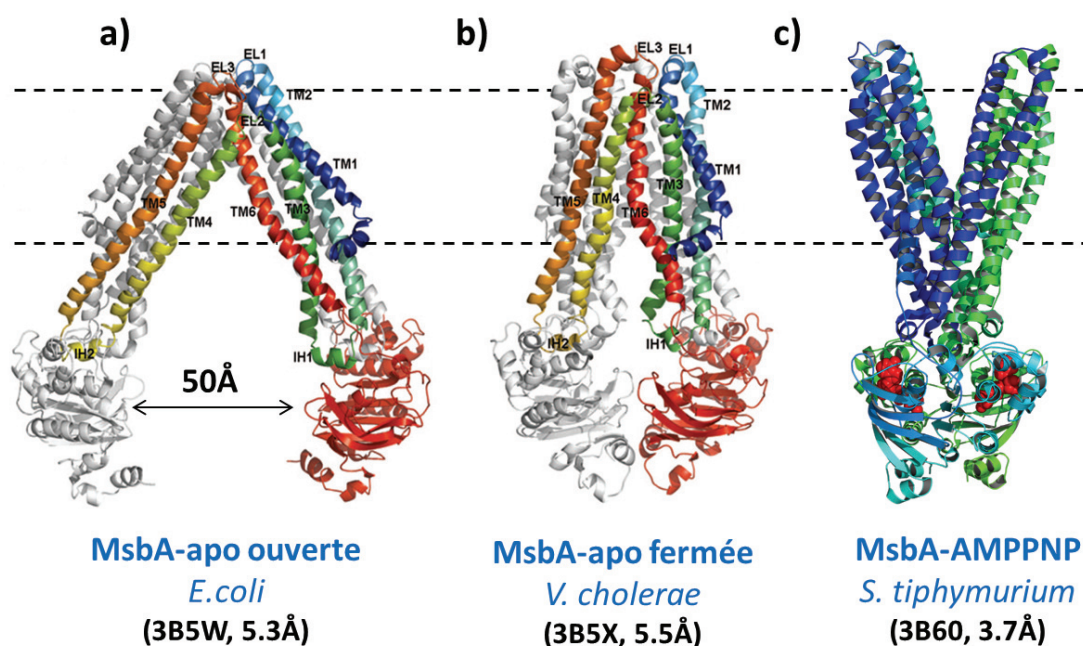
Ces rétractations de structures ont eu un grand écho au sein de la communauté scientifique étant donné les cinq années séparant la parution et la rétractation des structures, avec pour conséquence la parution pendant cette période de travaux basés sur ces modèles structuraux et aux conclusions erronées.

### (b) Les structures corrigées

Les structures corrigées de MsbA ont été republiées en 2007 (Ward *et al.*, 2007) : une forme apo ouverte (PDB : 3B5W, 5.3 Å) et fermée (PDB : 3B5X, 5.5 Å) et deux formes fermées, l'une en complexe avec l'AMPPNP (PDB : 3B60, 3.7 Å) et l'autre avec l'ADP-VO<sub>4</sub> (PDB : 3B5Z, 5.3 Å). La figure 34 illustre les trois conformations différentes de MsbA.

Les modèles corrigés présentent désormais la même topologie que Sav1866. La structure de MsbA-AMPPNP (*S. typhimurium*) révèle une cavité ouverte vers l'extérieur de la cellule et la formation d'un dimère fermé des NBDs. Sa superposition avec Sav1866-AMPPNP indique un rmsd <2.2 Å sur la position des Cα de l'ensemble des résidus. L'hélice intracellulaire 1 (ICL1) qui relie les TM2 et 3 interagit avec les résidus de la boucle P et de la signature ABC des deux NBDs alors que l'hélice intracellulaire 2 (ICL2) se situe entre les domaines α et β du NBD du monomère opposé. L'hélice TM6 se termine par une longue boucle qui recouvre la partie externe du NBD.

MsbA d'*E.coli* correspond à une conformation ouverte dans laquelle les extrémités extracellulaires des TMDs sont en interaction formant une molécule en V inversé et dans laquelle les NBDs sont séparés par une distance de 50 Å.



**Figure 34 : Structures cristallographiques de MsbA.**

Adapté de Ward et *al.*, 2007

**A)** MsbA apo ouverte. **B)** MsbA apo fermée. **C)** MsbA-AMPPNP. Les hélices transmembranaires (TM 1-6), les boucles extra- et intracellulaires sont indiquées. Les molécules d'AMPPNP sont colorées en rouge dans la structure de MsbA-AMPPNP.

La troisième, obtenue à partir de MsbA de *V. Cholerae* est une structure apo fermée dans laquelle les TMDs et les NBDs sont fortement resserrés. Les NBDs ne forment pas de dimère et les boucles P des monomères opposés sont positionnées l'une en face de l'autre. Cette dissociation partielle des NBDs a aussi été observée par microscopie électronique sur MDR1 et CFTR ainsi dans les structures cristallographiques de BtuCD et HI1470/1.

Il convient de rester prudent vis-à-vis de ces nouveaux modèles. Seul celui de MsbA lié à l'AMPPNP représente une structure d'une résolution assez satisfaisante (3.7 Å), et a d'ailleurs guidé la reconstruction des trois autres parues. Les structures apo résolues à faible résolution (5.0 et 5.5 Å) ne représentent que la forme du squelette polypeptidique (seule la position des carbones  $\alpha$  a été déposée dans la PDB pour ces deux modèles).

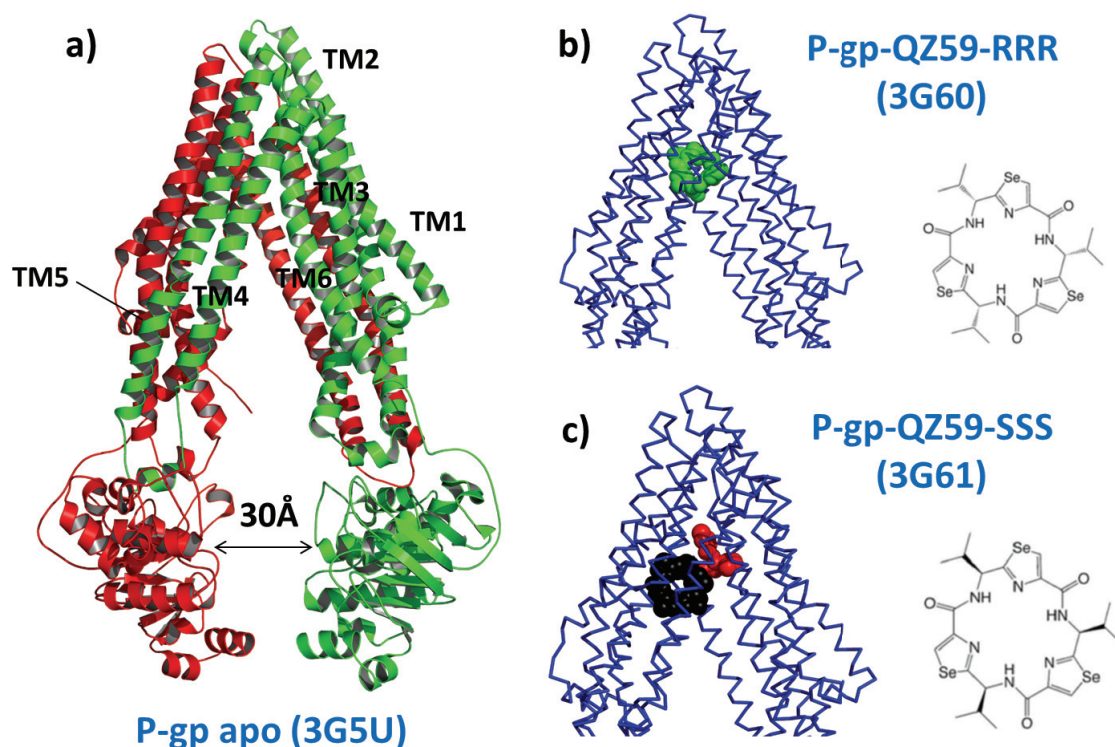
### (3) La glycoprotéine P

#### (a) La P-gp de *Mus musculus* (2009)

En 2009, la première structure d'un transporteur ABC eucaryote, la P-gp de souris (87 % d'identité de séquence avec la P-gp humaine) a été résolue, dans une forme apo (PDB : 3G5U, 3.8 Å) et en complexe avec les deux stéréoisomères d'un hexapeptide cyclique, le QZ59 (figure 35 b-c). Ces composés inhibent le transport de calcéïne et de colchicine par la P-gp (Aller et *al.*, 2009).

La structure de P-gp est composée de deux faisceaux de six hélices transmembranaires (TMs 1-3, 6, 10, 11 et TMs 4, 5, 7-9, 12) avec les NBDs séparés par une distance de 30 Å, ce qui laisse place à une large cavité de 6 000 Å<sup>3</sup> ouverte sur le cytoplasme. Deux entrées (entre les TMs 4/6 et 10/12) permettent aux molécules hydrophobes d'accéder au transporteur directement depuis la bicouche lipidique.





**Figure 35 : Structures cristallographiques de la P-gp de *Mus musculus*.**

**A)** Structure de P-gp. Les hélices TMs 1 à 6 sont colorées en vert et les TMs 7 à 12 en rouge.  
**B)** Localisation du QZ59-RRR (vert) et **C)** des deux QZ59-SSS (noir et rouge).

L'isomère R (QZ59-RRR) se fixe au centre de la protéine entre les hélices 6 et 12 (PDB : 3G60, 4.4 Å) alors que l'isomère S (QZ59-SSS) se fixe sur deux sites (l'un situé en dessous et l'autre au-dessus du site correspondant au QZ59-RRR) (PDB : 3G61, 4.35 Å). Les structures de P-gp-QZ59s montrent que la conformation ouverte des NBDs peut fixer des médicaments.

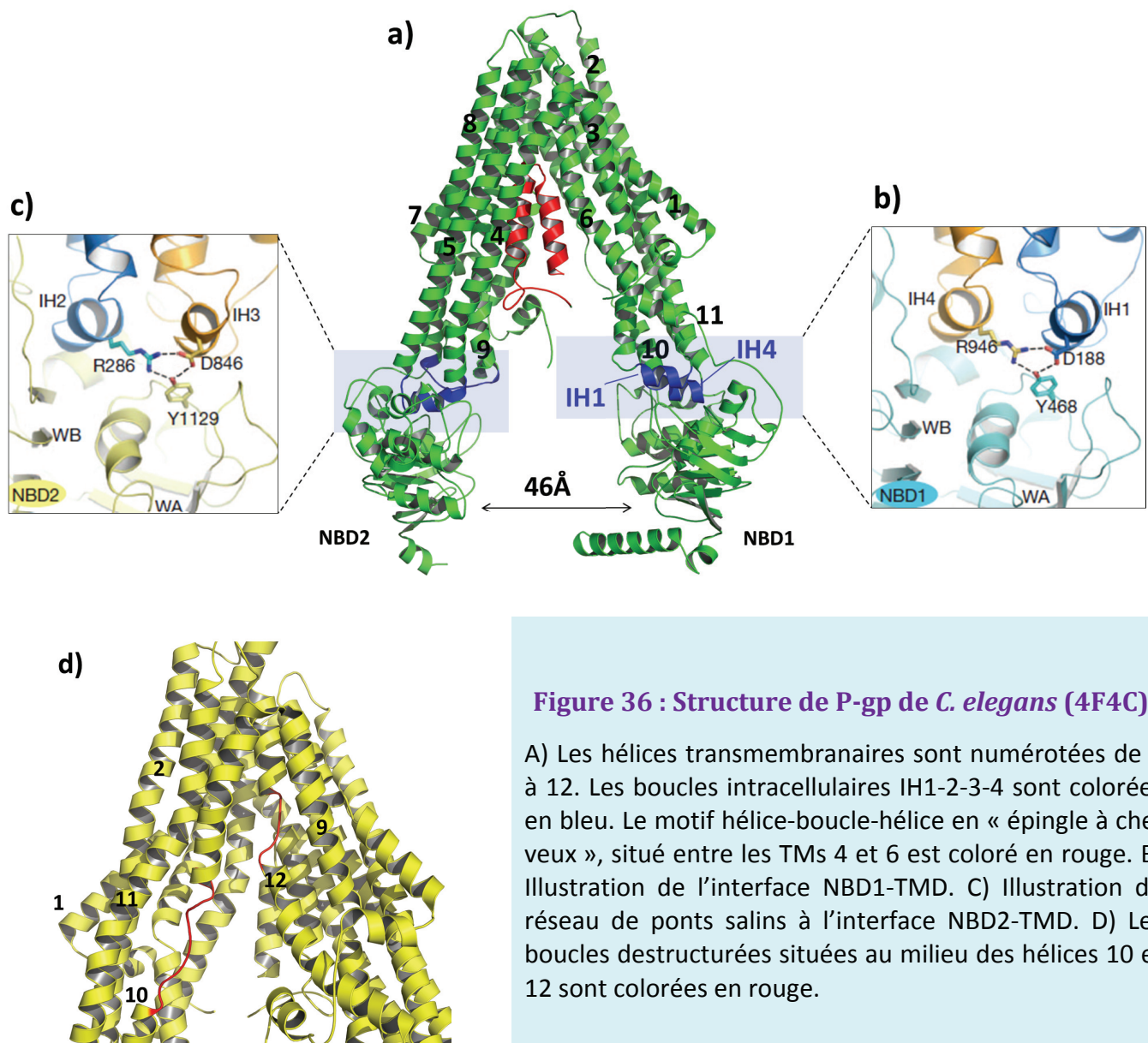
#### (b) La P-gp de *Caenorhabditis elegans* (2012)

En 2012, le groupe de J. Chen publiait une structure de la glycoprotéine-P du nématode *Caenorhabditis elegans* (46 % d'identité de séquence avec la P-gp humaine) dans une forme apo (PDB : 4F4C, 3.4 Å) (figure 36).

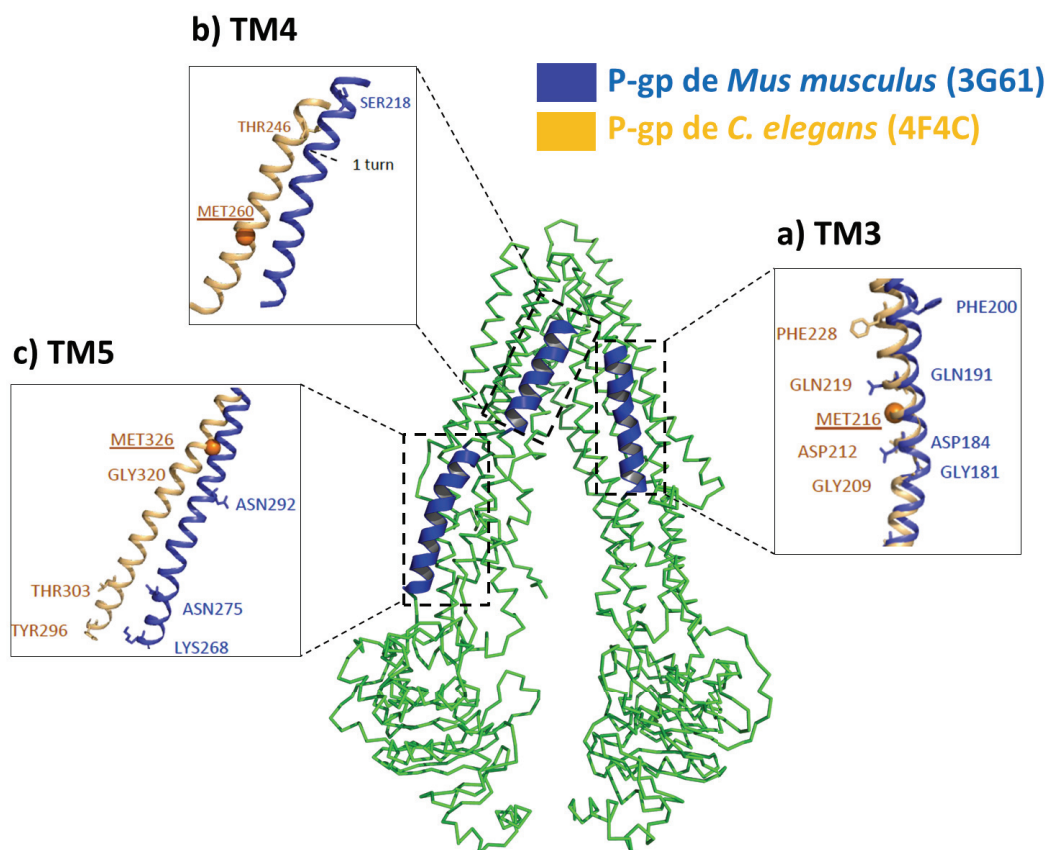
A l'extrémité N-terminale, un motif hélice-boucle-hélice en « épingle à cheveux » est situé entre les TMs 4 et 6 et bloque l'accès au transporteur. Une autre caractéristique inattendue est la présence d'une boucle déstructurée au milieu des hélices 10 et 12 (figure 36d). Cette discontinuité des hélices transmembranaires jouerait un rôle important dans la reconnaissance des substrats. D'autres transporteurs comme l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  (PDB : 1SU4) présentent un motif similaire impliqué dans la fixation et le transport du calcium.

Les hélices intracellulaires qui relient les TMs 2-3 (IH1), 4-5 (IH2), 8-9 (IH3) et 10-11 (IH4) s'insèrent dans une cavité à la surface des NBDs (figure 36 b-c). A l'interface NBD1-TMD, trois résidus conservés : Arg 946 (IH4), Asp 188 (IH1) et Tyr 468 (NBD1) établissent des liaisons ioniques et Hydrogène. Ce réseau de ponts salins est également présent à l'interface

NBD2-TMD avec les résidus Arg 286 (IH2), Asp 846 (IH3) et Tyr 1129 (NBD2). Chez l'importateur de maltose MalFGK<sub>2</sub>, la mutation des résidus correspondants conduit à un transporteur inactif et à une dissociation de la sous-unité MalK. L'importance à la fois structurale et fonctionnelle de ces interactions est renforcée par le haut degré de conservation des aminoacides (environ 80%) dans cette région entre la P-gp humaine et celle de *C. elegans*.



La superposition de la structure de P-gp de *C. elegans* avec celle de souris montre que la construction des TMs 1, 2, 6, 7, 8 et 11 est identique. En revanche, les TMs 3, 4 et 5 de la P-gp de souris (impliqués dans la fixation des inhibiteurs) comportent des erreurs dans l'attribution des aminoacides. Les acides aminés 184 à 200 du TM3 sont décalés d'un résidu (figure 37a). Ceux des hélices TM4 (résidus 217-251) (figure 37b) et 5 (figure 37c) sont décalés respectivement de quatre (un tour d'hélice) et trois résidus.



**Figure 37 : Comparaison des TMs 3, 4 et 5 des structures de P-gp de souris et *C. elegans*.**

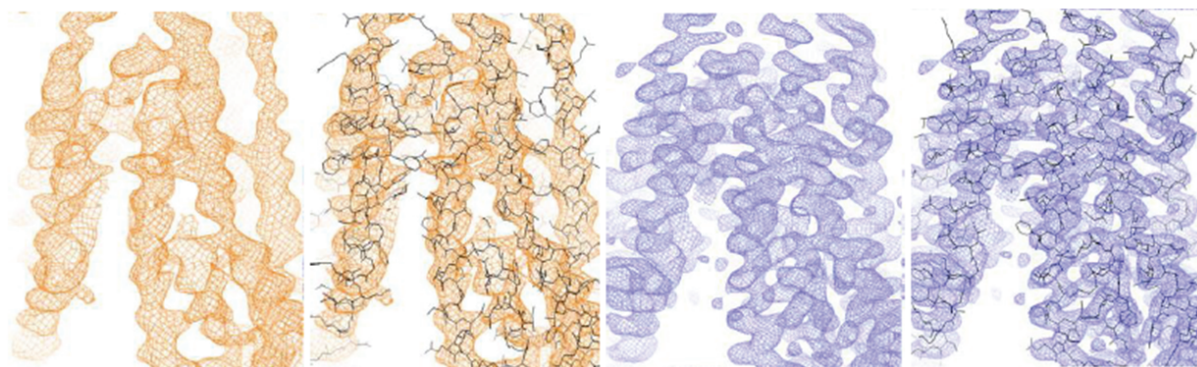
**A)** Les résidus 184 à 200 du TM3 sont décalés d'un résidu. **B)** Les résidus 217 à 251 du TM4 sont décalés de quatre résidus. **C)** Les résidus 268 à 300 sont décalés de trois résidus.

#### (c) Révision des structures de 2009

L'incompatibilité des structures de la P-gp de souris avec celle de *C. elegans* au niveau des TMs 3, 4 et 5 a conduit Li et ses collaborateurs à publier en 2013 de nouvelles structures corrigées. Les structures de 2009 avaient été résolues par la méthode MAD (Multiple-wavelength Anomalous Diffraction) en marquant les neuf cystéines natives de P-gp par des atomes de mercure. Mais l'inconvénient de cette méthode est de devoir collecter au moins deux jeux de données de diffraction à plusieurs longueurs d'onde dans la région du seuil d'absorption du diffuseur anomal.

Dans le cas de Aller, le cristal a subi des dommages de radiation ce qui a entraîné la perte des réflexions à haute résolution pour le second jeu de données. Une carte de densité a pu être calculée à partir de données à seulement 4.5 Å, ce qui a conduit l'expérimentateur à commettre quelques erreurs dans la construction du modèle (figure 38).



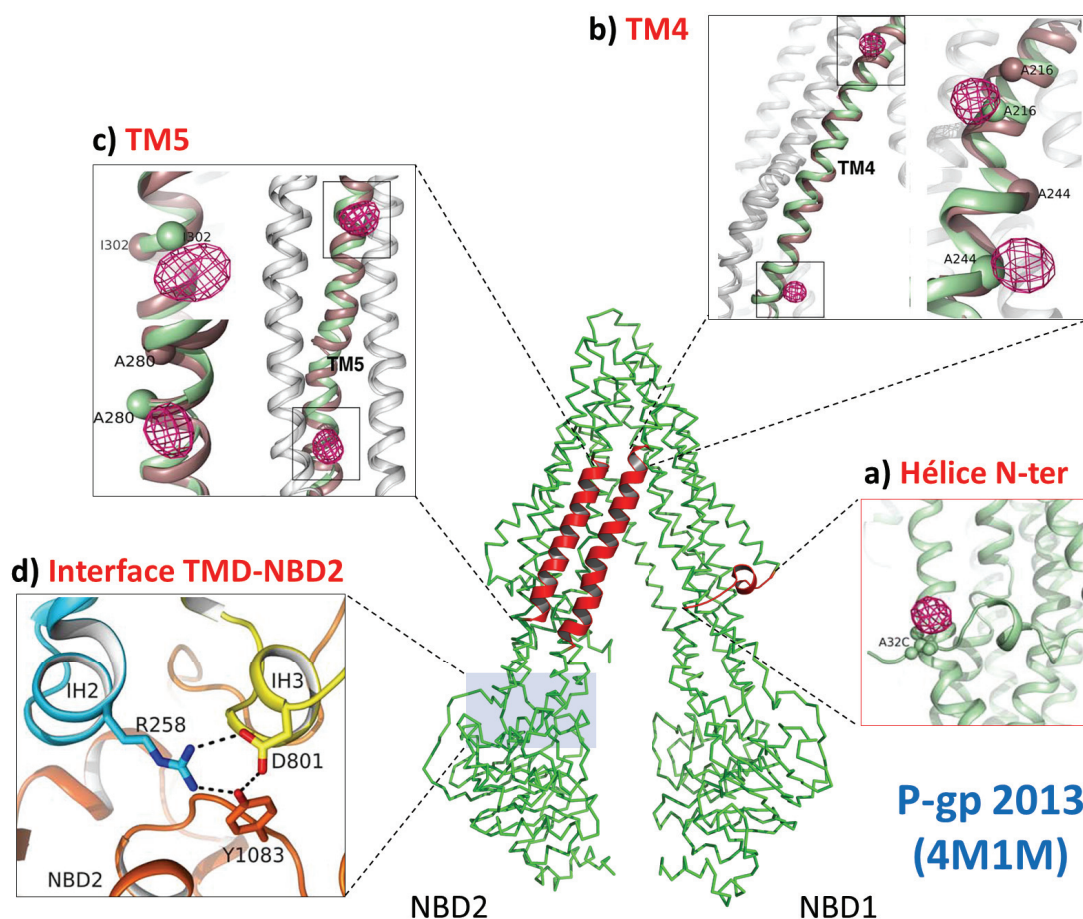
**P-gp (2009)****P-gp (2013)**

**Figure 38 : Comparaison des cartes de densité électronique de la P-gp de 2009 et 2013.**

La carte de densité électronique a pu être grandement améliorée par la méthode SAD (*single wavelength anomalous diffraction*) qui ne nécessite qu'une seule collecte de données à une longueur d'onde. Après affinement, le modèle de P-gp (PDB : 4M1M, 3.8 Å) présente d'excellentes statistiques avec une diminution de 9.4 % du  $R_{\text{work}}$  et 8.1 % du  $R_{\text{free}}$  ( $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$  : 0.212/0.266). 95 % des résidus se situent désormais dans les régions favorables du diagramme de Ramachandran (contre seulement 57 % dans le modèle de 2009).

Les corrections les plus significatives concernent l'hélice N-terminale qui a subi une réorientation de 90° (figure 39a) et les résidus des TMs 4 et 5 qui ont été réattribués (figure 39b-c). Ces modifications ont été validées en cristallisant trois mutants cystéines marqués au mercure (A32C, A216C/A244C, A280C/I302C) de la P-gp de souris. Le signal anomal émit par l'atome lourd permet de localiser les résidus cystéines au sein de la structure tridimensionnelle. Les hélices couplantes (IH1, IH2, IH3 et IH4) ont également été remodelisées (figure 39d). Une triade de résidus (arginine, asparagine et tyrosine) établit désormais, comme dans la structure de P-gp de *C. elegans*, des liaisons ioniques et hydrogènes aux interfaces IH1-IH4-NBD1 et IH2-IH3-NBD2. Il a été montré que la formation d'un pont salin entre l'acide glutamique 256 et l'arginine 276 (au-dessus de l'IH1) était critique pour le repliement de la P-gp humaine. Dans la nouvelle structure de la P-gp de souris, les résidus correspondants (E252 et R272) forment cette fois-ci bien une liaison ionique. D'autres changements plus mineurs ont été apportés dans les TMs 3-8-9-12 et les boucles extracellulaires. Le détail de ces corrections est rapporté par Li et *al.* (2014).

La structure de P-gp de souris est maintenant en accord avec les études biochimiques de Loo et Clarke menées sur la P-gp humaine, concernant les résidus impliqués dans la fixation des substrats (Loo et Clarke, 2006; 2009; 2013) et de pontage intramoléculaire entre les TMs 2/11 (Loo et Clarke, 2004), 5/8 (Loo et Clarke, 2004), NBD1/IH4 (Zolnerciks et *al.*, 2007) et NBD2/IH2 (Loo et Clarke, 2008).



**Figure 39 : Validation des TMs 4, 5 et de l'hélice N-ter de la P-gp de 2013.**

A) Validation de l'hélice N-terminale et des TMs 4 et 5 en mutant en cystéines et en marquant au mercure les résidus A32, A216, A244, A280 et I302. D) Observation de l'interface NBD-TMD2 remodelisée.

#### (d) Nouvelles structures de P-gp (2013)

En 2013, trois nouvelles structures inward facing de la P-gp de souris dérivées de deux formes cristallines différentes (PDB : 4KSB, 3.8 Å et 4KSC, 4 Å) ont été publiées (Ward et *al.*, 2013). L'une des structures a été résolue en complexe avec un nano-anticorps (PDB : 4KSD, 4.1 Å) (figure 40).

Afin de répondre aux critiques concernant la faible résolution de ces structures, Ward et ses collaborateurs ont validé leurs modèles en construisant 63 mutants cystéines de la P-gp. 17 d'entre eux ont cristallisé et ont ensuite été trempés dans du chlorure d'éthylmercure afin de localiser les résidus cystéines marqués dans la structure tridimensionnelle. A cela s'ajoute les sept cystéines natives qui avaient pu être localisées dans les structures de 2009. Au total, ce sont donc 24 positions qui valident le modèle de P-gp (figure 40a). Ces structures sont globalement en accord avec celles corrigées de 2009 notamment au niveau des TMs 3-4 et 5. Mais des différences persistent encore dans les régions non validées par

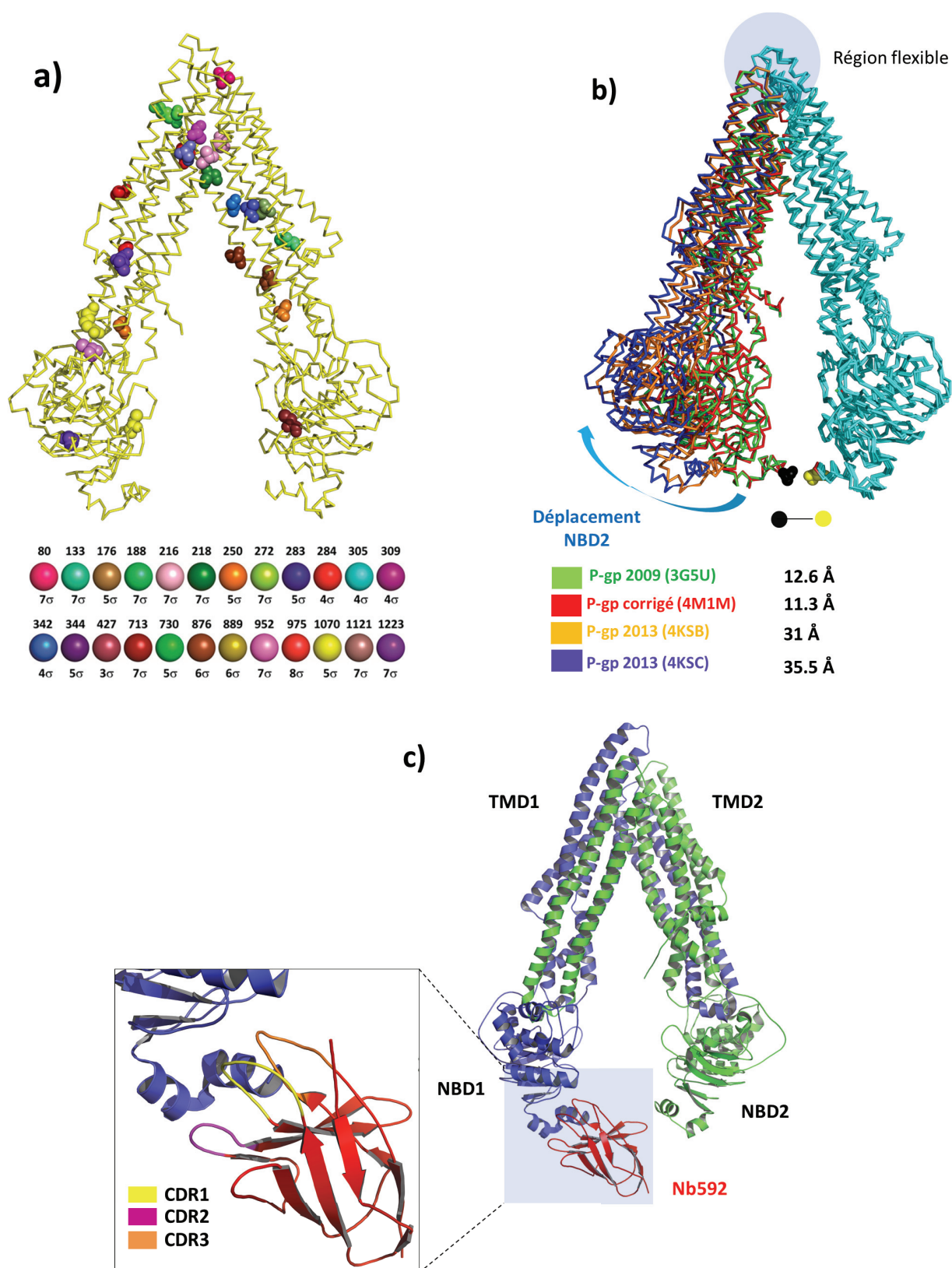
une cystéine marquée. Les interfaces IH1-IH4-NBD1 et IH2-IH3-NBD2, les TMs 8-9 et 12 ainsi que l'hélice N-terminale sont modélisés différemment.

La particularité de ces nouvelles structures est d'adopter une conformation inward facing encore plus ouverte que celle des autres exportateurs ABC décrits précédemment. La séparation entre les deux NBDs (mesurée entre la thréonine 626 de NBD1 et l'alanine 1271 de NBD2) est d'environ 31 et 36 Å contre 13 Å pour la P-gp de 2009 et 11 Å pour celle corrigée de 2013.

La superposition de ces quatre structures sur la première moitié de la chaîne peptidique de P-gp (résidus 33-209, 852-961 et 320-626) montre un déplacement évident de la partie C-terminale (figure 40b). Ce mouvement s'organise autour d'une région flexible composée des boucles extracellulaires qui relient les TMs 3-4 (résidus 206-208), 5-6 (résidus 319-324), 8-9 (résidus 849-851) et 10-11 (résidus 963-968). On peut supposer que l'entrée et la fixation d'un substrat aussi imposant que la  $\beta$ -amyloïde (4 kDa), peptide transporté par la P-gp, nécessite une ouverture encore plus importante des TMs 4-6 et 10-12.

La troisième structure (PDB : 4KSD, 4.1 Å) illustre l'interaction entre la P-gp et un nano-anticorps de chameau appelé Nb592 (15 kDa) au niveau de la partie C-terminale de NBD1 qui fige le transporteur dans une conformation ouverte vers l'intérieur (NBDs séparés de 30 Å) (figure 40c). Le nano-anticorps interagit spécifiquement avec NBD1 via trois boucles hypervariables (appelées CDR pour Complementarity Determining Region). La structure de P-gp complexée à Nb592 a permis d'identifier un épitope unique au sein de NBD1 puisque l'alignement des séquences protéiques de la P-gp humaine et de souris montre une très forte similarité au niveau du site de liaison avec le nano-anticorps.

Le Nb592 peut être utilisé comme chaperon de cristallisation pour stabiliser la conformation de la protéine mais il s'agit également d'un bon inhibiteur de l'activité ATPasique de la P-gp ( $IC_{50}$  :  $0,52 \pm 0,06 \mu m$ ) puisqu'il empêche la dimérisation des NBDs, l'une des étapes clé du cycle de transport des substrats. Cette approche pourrait constituer une alternative aux inhibiteurs chimiques comme le tariquidar ( $IC_{50}$  : 43 nm) qui ciblent la poche de fixation des substrats dans les TMDs. De plus, ce type de molécule est stable et donc facilement administrable par voie intraveineuse et topique. Il présente un potentiel thérapeutique si l'on trouve une solution pour qu'ils pénètrent les cellules pour aller trouver leur cible.



**Figure 40 : Structures cristallographiques de P-gp apo (2013) et en complexe avec Nb592.**

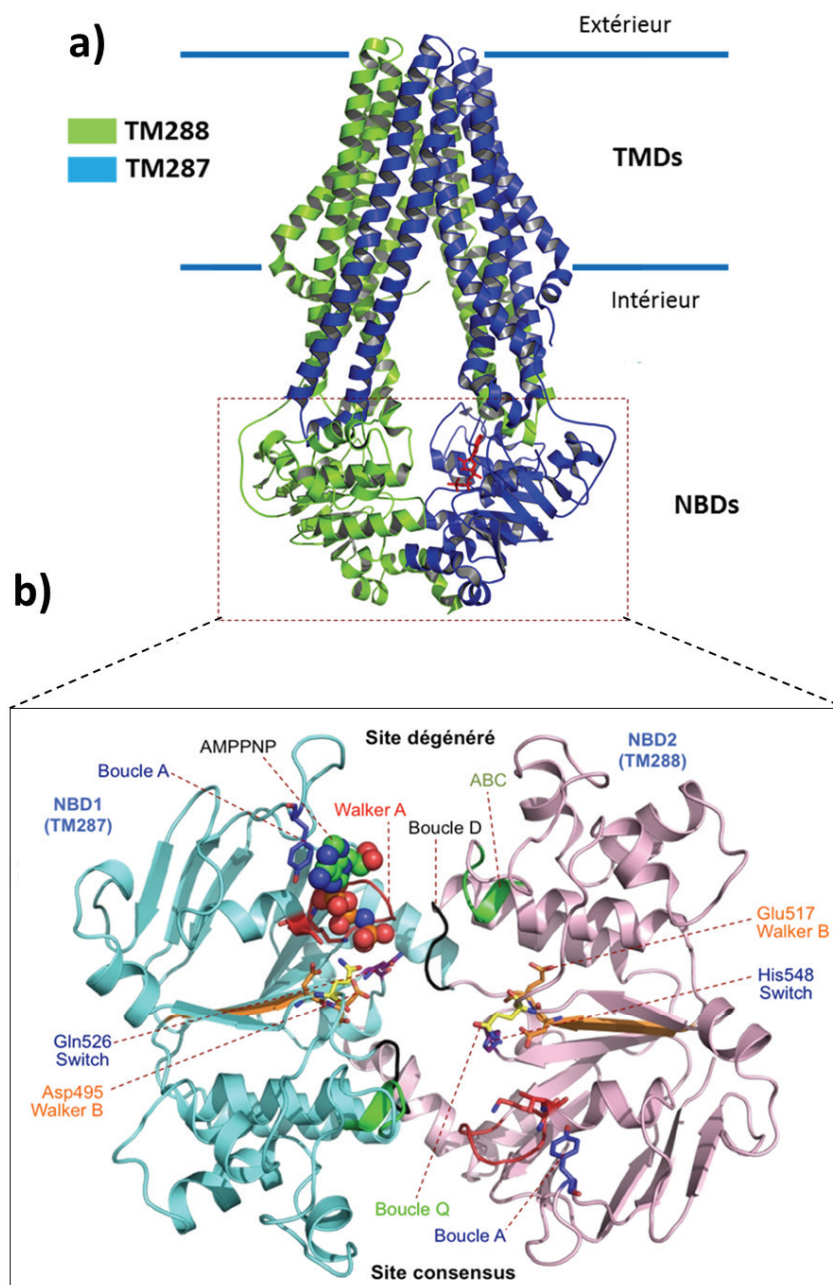
A) Position des 24 résidus cystéine marqués par du chlorure d'éthyl-mercure. B) Superposition des structures de P-gp sur la première moitié de la chaîne polypeptidique (résidus 33-209, 852-961 et 320-626). C) Structure de P-gp en complexe avec le nano-anticorps Nb592.



#### (4) L'exportateur hétérodimérique TM287/TM288

La première structure d'un exportateur ABC hétérodimérique, TM287/288 de la bactérie thermophile *Thermotoga maritima*, a été résolue en 2012 en présence d'AMPPNP (Hohl et *al.*, 2012) (PDB : 3QF4, 2.9 Å) (figure 41a). Les domaines nucléotidiques de ce transporteur sont asymétriques avec un site consensus qui est composé de motifs conservés et un second non catalytique (dégénéré) dans lequel le motif Walker B et la région switch de NBD1 (TM287) ainsi que la signature S et la boucle D de NBD2 (TM288) devient de leur séquence consensus.

Le transporteur adopte une conformation inward facing avec une molécule d'AMPPNP qui est fixée dans le site dégénéré mais qui est absente du site consensus (figure 41b). Contrairement aux structures inward facing de MsbA et P-gp dans lesquelles les NBDs sont séparés, ceux de TM287/288 restent en contact mais ne forment pas de dimère. L'AMPPNP interagit avec le Walker A et la boucle A de NBD1 ainsi qu'avec le résidu asparagine 521 de la boucle D de NBD2 (figure 41b). La signature ABC de NBD2 est éloignée d'environ 9 Å du nucléotide.



**Figure 41 : Structure cristallographique de TM287/TM288-AMPPNP (3QF4).**

Adapté de Hohl et al., 2012.

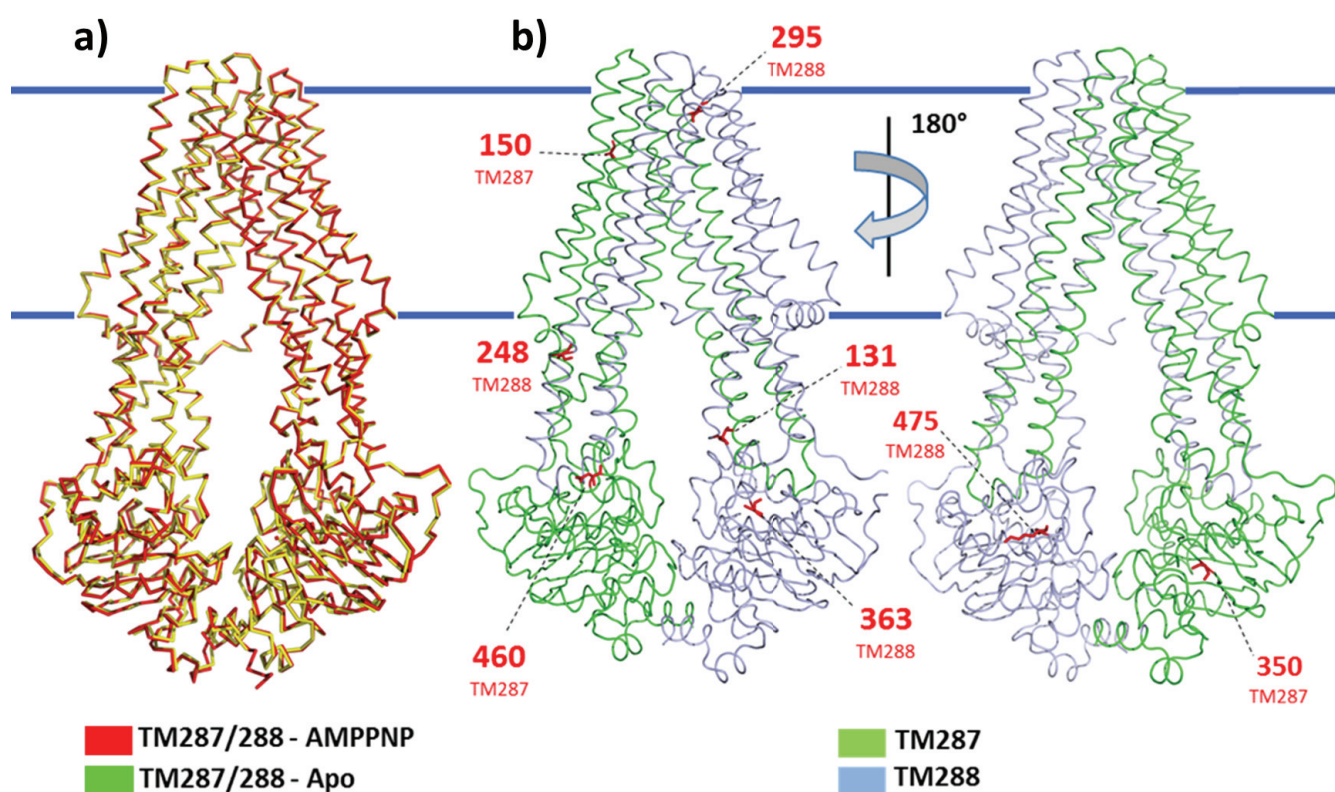
A) TM287 et 288 sont colorés respectivement en bleu et vert. B) Les NBDs de TM287/288 sont asymétriques. En haut, représentation du site dégénéré dans lequel le motif Walker B et la région switch de NBD1 (TM287) ainsi que la signature S et la boucle D de NBD2 (TM288) devient de leur séquence consensus. En bas, représentation du site consensus qui est composé de motifs conservés

Dans le site dégénéré, les NBDs sont maintenus en contact par un réseau de liaisons Hydrogène qui s'établit entre les résidus du Walker A de NBD1 et la boucle D de NBD2. Alors

que dans le site catalytique, les NBDs interagissent seulement entre la boucle D de NBD1 et la thréonine 390 du walker A de NBD2.

La question qui se pose est : pourquoi un nucléotide est-il retrouvé dans le site dégénéré et pas dans le site catalytique ? La caractérisation biochimique des NBDs montre que les deux sites présentent la même capacité à fixer l'ATP (Hohl et *al.*, 2014). En revanche, l'affinité du nucléotide est nettement meilleure pour le site dégénéré. Par ailleurs, des expériences de compétition de fixation montrent que l'interaction de l'AMPPNP avec TM287/288 est environ trois fois moins forte qu'avec l'ATP, ce qui expliquerait pourquoi un seul nucléotide est présent dans la structure. Une étude réalisée sur CFTR montre que la durée de fixation de l'ATP sur le site dégénéré est cinquante fois plus importante que la durée totale d'un cycle de transport (Tsai et *al.*, 2010). Une molécule d'ATP pourrait ainsi rester fixée au site dégénéré de TM287/288 au cours de plusieurs cycles de transport sans avoir besoin d'être hydrolysée.

En 2014, Hohl et ses collaborateurs ont déterminé la forme apo de TM287/288 (PDB : 4Q4H, 2.53 Å). Sa superposition avec la structure de TM287/288-AMPPNP montre qu'elles sont très proches avec un RMSD de 0.636 Å sur les C $\alpha$  des résidus 1-569 (TM287) et 10-592 (TM288). Les NBDs restent en contact même en absence de nucléotides (figure 42a).



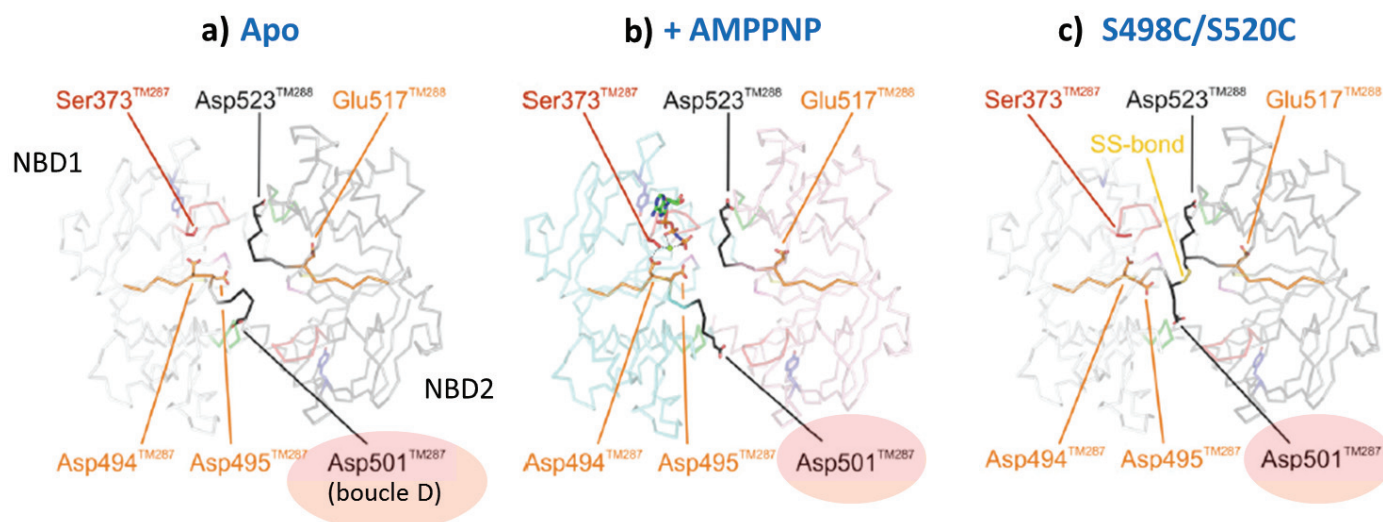
**Figure 42 : Différences structurales entre les structures de TM287/288-AMPPNP et apo.**

A) superposition de TM287/288-AMPPNP (en rouge) avec TM287/288-apo (en vert). B) Localisation des résidus marqués (en rouge) pour les expériences de DEER réalisées sur TM287/288.

Plusieurs sites de TM287/288 ont été sélectionnés au niveau des régions extracellulaire, intracellulaire et dans les NBDs asymétriques pour être marqués (figure 42b) et étudiés par la technique de double résonance électron-électron (DEER). Les distances mesurées entre les résidus  $350^{\text{TM287}}/475^{\text{TM288}}$  et  $460^{\text{TM287}}/363^{\text{TM288}}$  confirment que les NBDs restent en contact en absence de nucléotides. L'ajout d'AMPPNP ne modifie que très légèrement les distances entre les résidus  $248^{\text{TM288}}/131^{\text{TM288}}$  et  $150^{\text{TM287}}/295^{\text{TM288}}$ , ce qui confirme que TM287/288 adopte bien une conformation inward facing en présence de nucléotides.

La principale différence structurale entre les formes apo et AMPPNP concerne la boucle D de NBD 1 dans le site consensus. En présence de nucléotides, l'aspartate 501 forme deux liaisons Hydrogène avec le motif Walker A de NBD2 (figure 43b). Celles-ci sont rompues dans la forme apo où la boucle D subit un important réarrangement conformationnel (figure 43a). La mutation en alanine de l'aspartate 501 inhibe l'activité ATPasique du transporteur. En revanche, la même mutation dans le site dégénéré n'altère pas sa fixation.

Hohl et ses collaborateurs ont muté en cystéine la sérine de chaque boucle D (498 dans TM287 et 520 dans TM288). La structure de ce mutant, résolue à 3.2 Å, montre la formation d'un pont disulfure entre les deux résidus (figure 43c). La boucle D de NBD1 est beaucoup plus flexible que celle de NBD2 dont la position n'est pas modifiée. Aucune molécule d'AMPPNP n'est présente dans le site dégénéré et le mutant conserve seulement 15% de l'activité ATPasique du sauvage. La flexibilité de la boucle D de NBD1 est donc indispensable pour la fixation du nucléotide dans le site dégénéré et l'hydrolyse de l'ATP dans le site consensus. Suite à la fixation d'un nucléotide dans le site dégénéré, l'information serait transmise au motif Walker A du site consensus grâce à la mobilité de la boucle D de NBD1.



**Figure 43 : Flexibilité conformationnelle de la boucle D de NBD1.**

Adapté de Hohl et *al.*, 2014.

A-B-C : Comparaison de la boucle D des sites consensus et dégénérés de TM287/288 en absence et présence de nucléotides. La boucle D (Asp501) est colorée en rouge.



La structure de TM287/288 en complexe avec l'AMPPNP est aujourd'hui en contradiction avec celles de MsbA et Sav1866. La fixation du nucléotide n'induit pas la conformation outward facing et la dimérisation des NBDs. Les études structurales sur TM287/288 devront s'attacher à déterminer d'une part si la fermeture des NBDs en absence de nucléotides est spécifique des exportateurs hétérodimériques, et d'autre part si l'implication de la boucle D dans la communication entre les deux sites de fixation des nucléotides concerne également les transporteurs homodimériques.

## (5) ABCB10, un exportateur ABC mitochondrial

ABCB10 (également appelé ABC-mitochondrial erythroid, ABC-me, mABC2 ou ABCBA) est un exportateur ABC homodimérique situé dans la membrane interne des mitochondries. Son rôle et ses substrats biologiques ne sont pas encore clairement identifiés. ABCB10 est exprimé lors de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et sa surexpression est corrélée à l'augmentation de la synthèse d'hémoglobine (Shirihai et *al.*, 2000). De récentes études indiquent que le transporteur protège la mitochondrie du stress oxydatif (Chloupkova et *al.*, 2003). Il constituerait une cible thérapeutique potentielle pour les maladies neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson) et le syndrome de reperfusion myocardique dans lesquelles une surproduction des espèces réactives de l'oxygène est observée (Liesa et *al.*, 2011).

La structure d'ABCB10 a été résolue en 2013 dans une forme apo (PDB: 3ZDQ, 2.85 Å) et en complexe avec deux analogues non hydrolysables de l'ATP (cristallisés dans des formes cristallines différentes) : l'AMPPNP (PDB: 4AYW, 3.3 Å ; forme plate) et l'AMPPCP (PDB: 4AYT, 2.85 Å et 4AYX, 2.9 Å ; forme de bâtonnets) (Shintre et *al.*, 2013) (figure 44).

Le repliement structural d'ABCB10 en absence de nucléotide est similaire à celui déjà observé chez MsbA, la glycoprotéine-P de souris et de *C. elegans*. Il adopte une conformation inward facing avec les TMDs qui forment une cavité ouverte sur le cytoplasme et les NBDs séparés de 17 Å.

De manière inattendue, en présence de nucléotides, ABCB10 adopte une conformation inward facing avec les NBDs séparés. Chaque NBD interagit avec un seul nucléotide au niveau du motif Walker A, et des boucles A (Tyr501) et Q (Gln 575). L'interaction avec la signature ABC de l'autre NBD est absente. La comparaison des quatre structures met en évidence la flexibilité conformationnelle du transporteur avec des variations dans l'ouverture de la cavité formée par les domaines transmembranaires. Ces structures sont en contradiction avec celles de MsbA et Sav1866 qui ont une conformation outward facing avec les NBDs dimérisés. Les structures ouvertes d'ABCB10 montrent que les nucléotides peuvent se fixer en absence de substrat, ce qui est cohérent avec le fait que les transporteurs ABC possèdent une activité ATPasique basale. Mais dans le cadre du cycle de transport, elles suggèrent que la fixation de nucléotides pourrait intervenir avant la fixation de substrat. Or, les structures de P-gp de souris montrent que les substrats ont la possibilité de se fixer en absence de nucléotide. Il se pose donc la question de savoir qui du substrat ou de l'ATP se fixe en premier

au cours du cycle de transport ? Nous discuterons de ce point dans la partie concernant le mécanisme de transport.

Dans les quatre structures d'ABCB10, des molécules de dodécyl maltoside et de cardiolipide interagissent avec la face extérieure du transporteur (figure 45a. Dans la structure avec AMPPCP (forme cristalline en bâtonnet), les TM1 et 2 sont séparés par une importante densité électronique que les auteurs attribuent à la chaîne alkyle d'une molécule de lipide. Sa longueur lui permet d'être en contact à la fois avec la cavité interne et la surface externe de la protéine. En revanche, dans la structure avec AMPPNP (forme plate), les deux hélices sont étroitement associées (figure 45b). Cette ouverture entre les hélices transmembranaires 1 et 2 pourrait constituer une voie d'accès à la cavité pour les substrats amphipatiques. Enfin, la présence de résidus conservés au sein des TM2 et 3 suggère la présence d'un site de fixation pour les substrats. Les études futures devront s'attacher à identifier ces substrats afin de mieux comprendre les fonctions et le rôle d'ABCB10 dans le stress oxydatif.

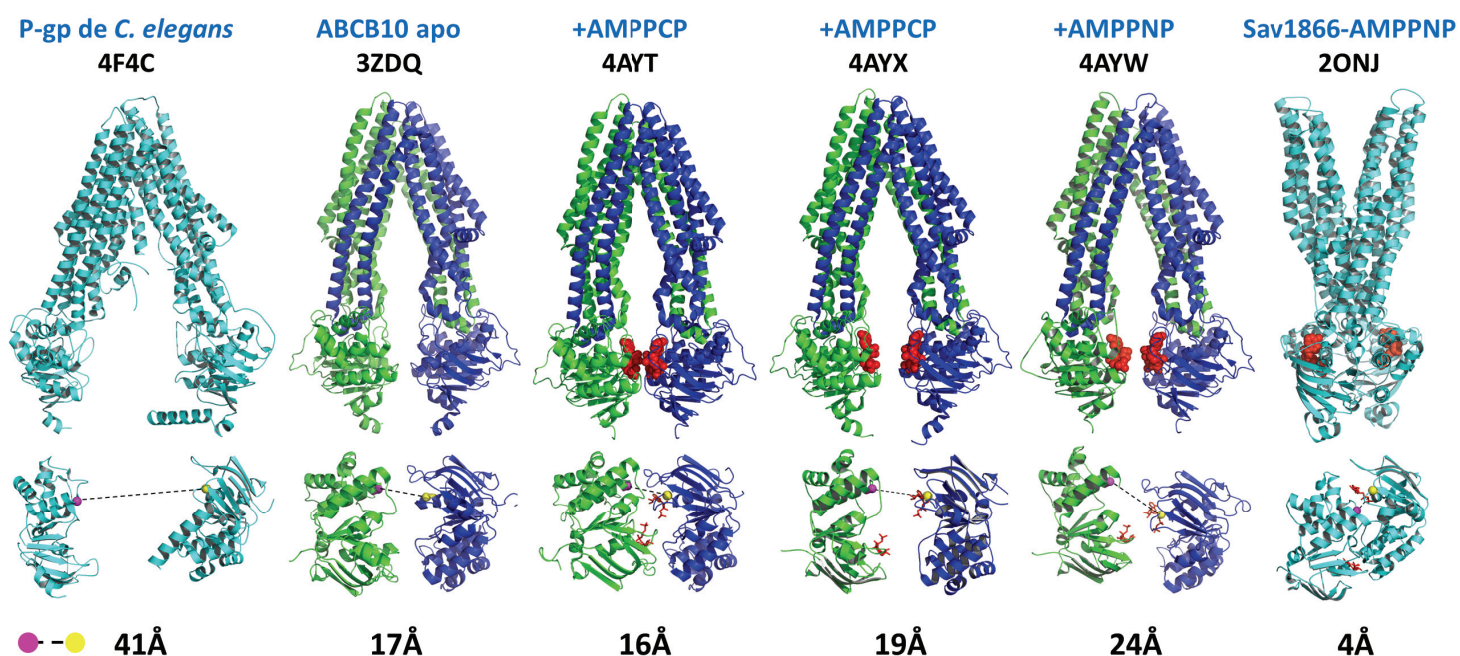
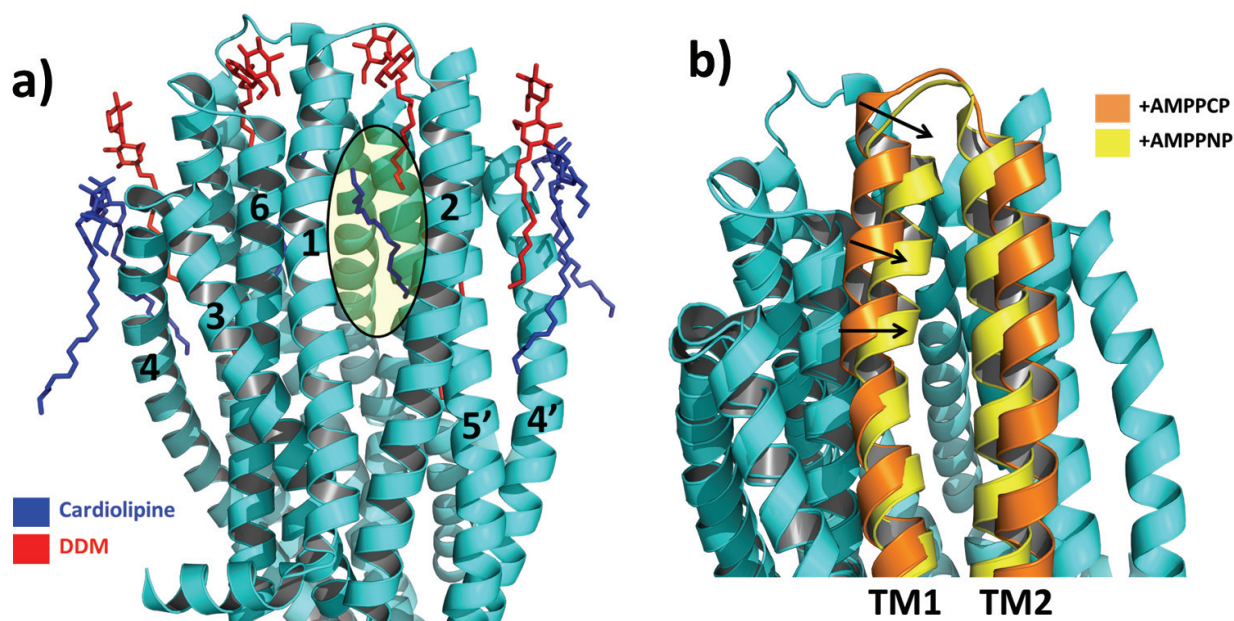


Figure 44 : Comparaison des structures d'ABCB10 en absence et présence de nucléotides.



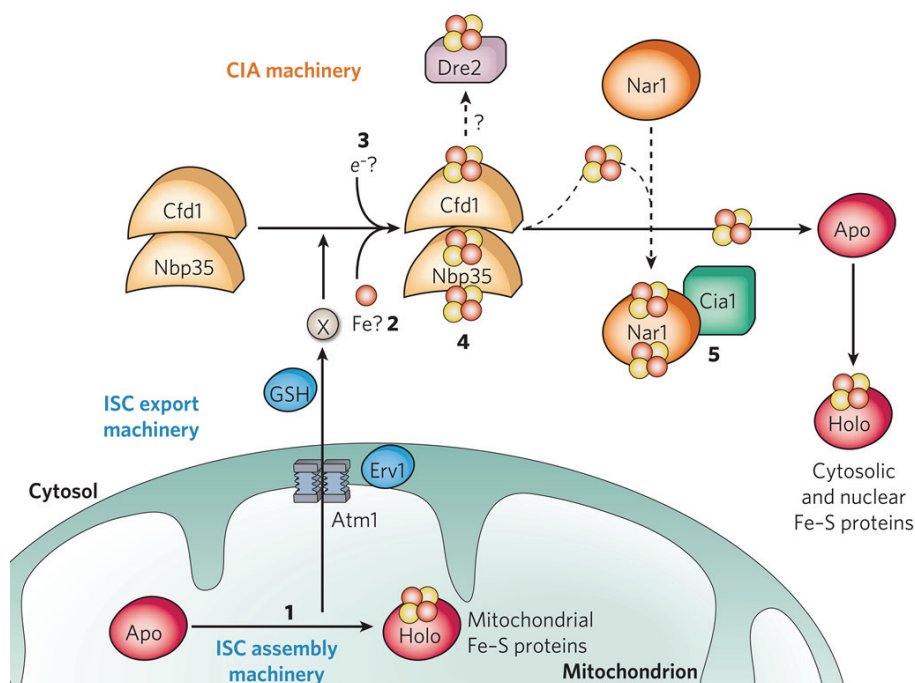


**Figure 45 : Localisation des molécules de détergent dans les structures d'ABCB10.**

A) Des molécules de dodécyl maltoside (rouge) et de cardiolipine (bleu) interagissent avec la face extérieure d'ABCB10. Entre les TM1 et 2, une molécule de lipide est en contact à la fois avec la cavité interne et la surface externe de la protéine. B) En présence d'AMPPNP, les hélices 1 et 2 (jaune) s'associent étroitement.

#### (6) *Atm1*, un transporteur ABC de levure

*Atm1* est un transporteur ABC de levure situé dans la membrane interne mitochondriale. Il est impliqué dans l'export des centres fer-soufre (Fe/S) de la mitochondrie vers le cytosol (figure 46). L'atome de soufre présent à l'intérieur des centres Fe/S est généré à partir de la L-cystéine par une cystéine désulfurase dans la mitochondrie. Une machinerie multiprotéique appelée ISC (Iron-Sulfur-Cluster) synthétise ensuite une molécule soufrée qui est transportée par *Atm1* dans le cytosol où a lieu la maturation et le transfert des centres Fe/S vers l'apoprotéine cible (Lill et *al.*, 2012). *Atm1* coopère avec la sulfhydryle oxydase *Erv1* dont le rôle moléculaire reste à déterminer. Le glutathion, un tri peptide antioxydant, stimule l'activité ATPasique d'*Atm1* et serait directement impliqué dans le transport (Kuhnke et *al.*, 2006).

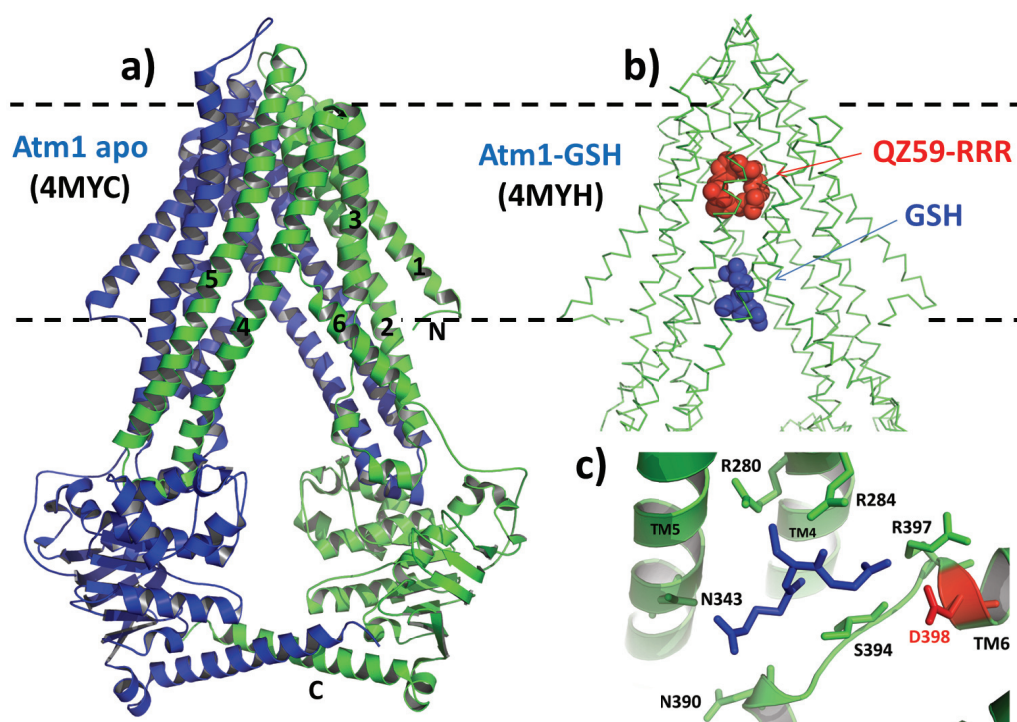


**Figure 46 : Rôle d'Atm1 dans la synthèse des protéines fer-soufre.**  
D'après Lill et *al.*, 2012.

La délétion du gène d'*Atm1* entraîne une accumulation de glutathion mitochondrial (Kispal et *al.*, 1997), de fer (Schilke et *al.*, 1999) un stress oxydant et un défaut de maturation des protéines Fe/S cytosoliques.

L'homologue d'*Atm1* chez l'homme est ABCB7 (45 % d'identité de séquence) dont les mutations provoquent une maladie génétique rare, l'anémie sidéroblastique liée à l'X (100 à 200 cas décrits jusqu'à maintenant). Les patients présentent des troubles neurologiques associés à une non coordination des mouvements. Elle se caractérise par une accumulation excessive de fer dans les mitochondries des érythroblastes, un défaut du transport des centres Fe/S vers le cytoplasme et affecte le métabolisme de l'hème (Maguire et *al.*, 2001).

La structure d'*Atm1* de *Saccharomyces cerevisiae* a été résolue en 2014 dans la forme apo (PDB: 4MYC, 3.08 Å) et en complexe avec une molécule de glutathion réduit (GSH) (PDB: 4MYH, 3.38 Å) (Srinivasan et *al.*, 2014). Les deux structures sont identiques avec un rmsd de 0.3 Å sur l'ensemble des résidus. Elles présentent en position C-terminale une hélice  $\alpha$  composée de 24 résidus, qui n'a jamais été observée dans les autres structures de transporteurs ABC (figure 47a). Dans la P-gp de *C. elegans*, une courte hélice est présente à la fin d'un des NBDs. Mais dans le cas d'*Atm1*, cette hélice interagit avec celle de l'autre monomère, ce qui connecte les deux NBDs et stabilise le dimère dans une conformation inward facing. La délétion de ces deux hélices diminue de 50% la production des protéines Fe/S cytosoliques.

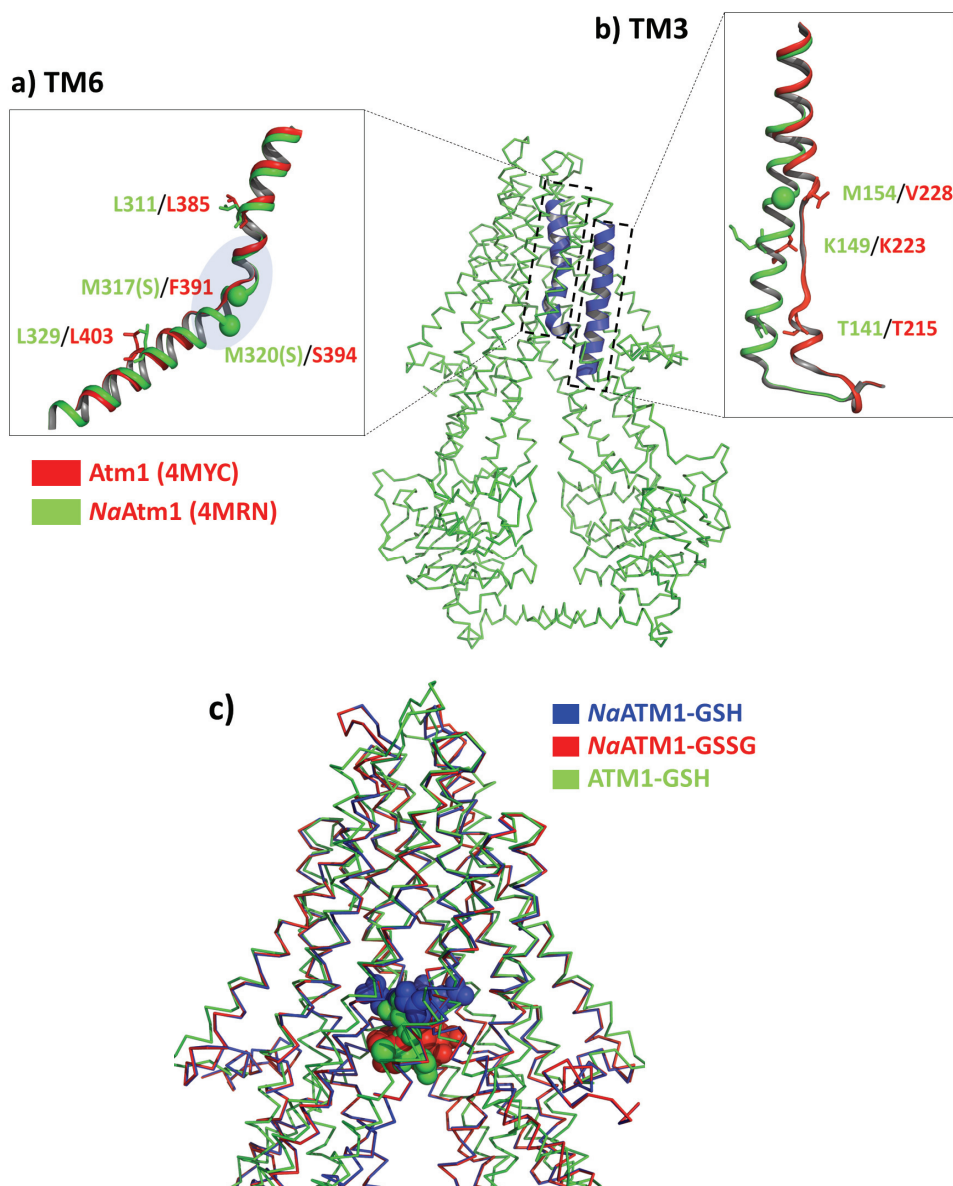


**Figure 47 : Structures d'Atm1 apo et en complexe avec le glutathion.**

A) En position C-terminale, les hélices  $\alpha$  de chaque monomère interagissent ensemble (bleu et vert). B) Comparaison de la localisation du GSH dans la structure d'Atm1 par rapport à celle du QZ59-RRR dans la structure de P-gp. C) Interaction du GSH avec les résidus des TMs 4, 5 et 6.

Le GSH se fixe dans une cavité hydrophile chargée positivement et accessible depuis le cytoplasme, contrairement aux inhibiteurs de P-gp qui s'insèrent dans une cavité hydrophobe au centre de la bicouche lipidique (figure 47b). Le GSH interagit avec les résidus arginine 280 et 284 du TM4, l'asparagine 343 du TM5, et les résidus N390, S394, R397, D398 du TM6 (figure 47c). Chez les patients atteints de XLSA/A, le résidu correspondant à D398 dans ABCB7 (E433) est muté en lysine et entraîne une diminution de la maturation des protéines Fe/S cytosoliques, ce qui démontre l'importance physiologique de la fixation du GSH. Mais son rôle moléculaire reste encore à déterminer. Le GSH ne peut en effet pas être le substrat physiologique d'Atm1 car il est synthétisé dans le cytosol. Le GSH pourrait interagir avec le cluster [2Fe-2S] dans la mitochondrie et ensuite être exporté par Atm1 dans le cytosol.

Lee et ses collaborateurs ont publié la même année la même structure d'Atm1 chez la bactérie *Novosphingobium aromaticivorans* (NaAtm1) dans la forme apo (PDB: 4MRN, 2.5 Å), puis en complexe avec le glutathion oxydé (GSSG) (PDB: 4MRS, 2.4 Å) et réduit (GSH) (PDB: 4MRP, 2.5 Å). NaAtm1 partage 45 % d'identité de séquence avec ABCB7 et Atm1 de *S. cerevisiae*.



**Figure 48 : Comparaison des structures d'Atm1 et NaAtm1.**

A) Dans la structure d'Atm1, les résidus 388-393 au milieu du TM6 sont modélisés par une boucle destructurée alors que dans NaAtm1 les résidus équivalents sont modélisés par une hélice  $3_{10}$ . B) Au milieu du TM3, les résidus 216 à 228 sont représentés par une longue boucle destructurée dans Atm1 et une hélice  $\alpha$  dans NaAtm1. C) Superposition des structures d'Atm1 en complexe avec le GSH (bleu et vert) et le GSSG (rouge).

Les différences structurales entre Atm1 et NaAtm1 apo se situent au niveau des TMs 6 et 12 impliqués dans la fixation du GSH et des TMs 3 et 9. Dans la structure d'Atm1, une boucle déstructurée est présente au milieu de l'hélice 6 (résidus 388-393) (figure 48a). Alors que dans NaAtm1, les résidus 314-317 sont modélisés par une hélice  $3_{10}$ , validée par les sélénométhionines 317 et 320. Au milieu du TM 3 d'Atm1, les résidus 216 à 228 sont modélisés par une longue boucle alors que les résidus correspondants forment une hélice  $\alpha$  dans

*NaAtm1* (figure 48b). Enfin, dans les deux structures les molécules de glutathion se fixent dans la même cavité formée par les TMs 4, 5 et 6 (figure 48c).

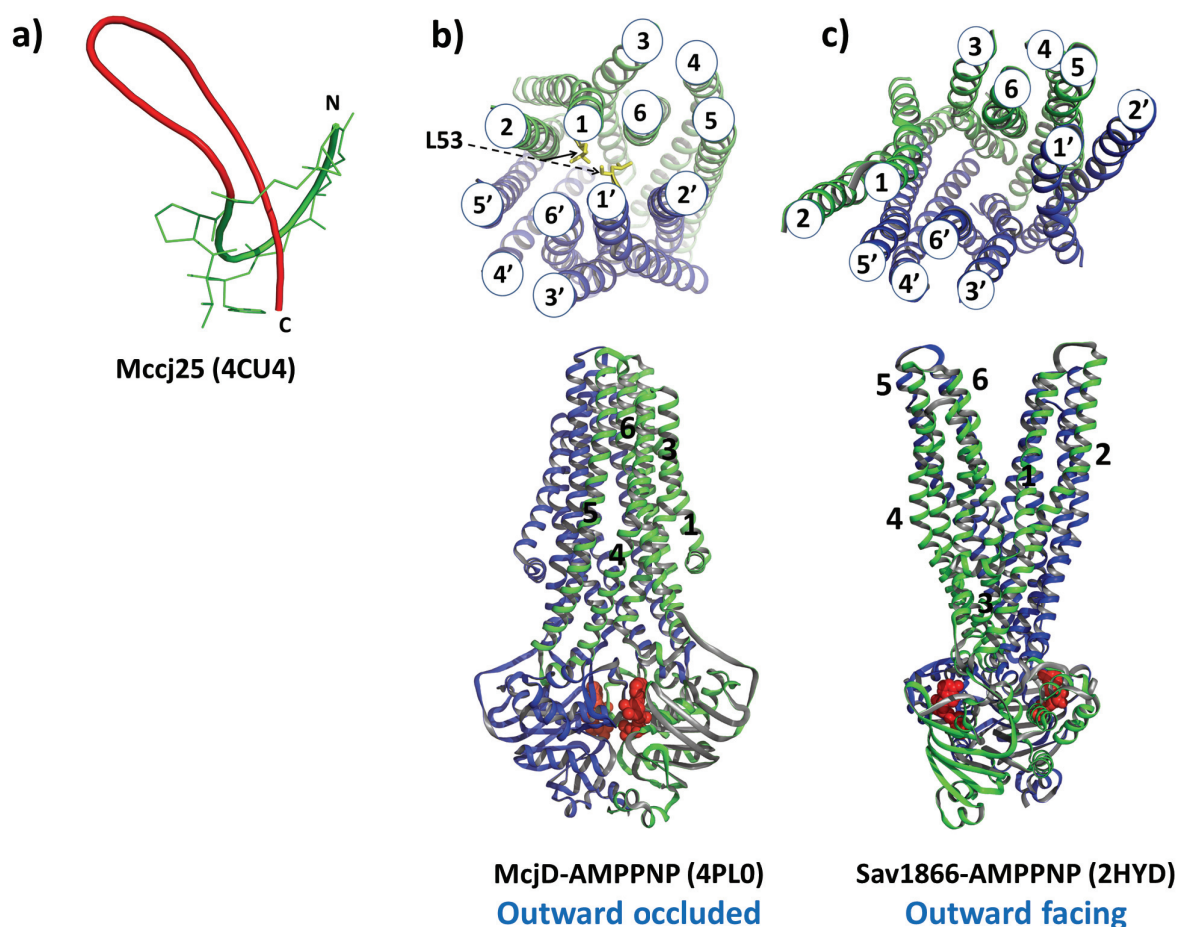
### (7) *McjD*, un transporteur de peptides antibactériens

La production de peptides antibactériens est une des stratégies qu'ont développées les bactéries pour survivre et résister lorsque les conditions de vie deviennent défavorables. Ces peptides de défense sont appelés microcines (<10 kDa) chez les entérobactéries et contribuent à la stabilité de la flore intestinale humaine.

La microcine J25 (*MccJ25*) est un peptide antibactérien de 21 acides aminés synthétisé par *E. coli*. Il possède une topologie dite « en lasso » consistant en un nœud moléculaire particulier (figure 49a). Les huit résidus de la partie-N terminale forment un cycle macrolactame à l'intérieur duquel est piégée irréversiblement la partie C-terminale. La structure est stabilisée par les résidus aromatiques Phe19 et Tyr20 qui sont situés de part et d'autre du plan formé par le cycle. *Mccj25* est codé par un cluster de gènes situé dans le plasmide *pTUC100*. Le gène *mcjA* code un précurseur de 58 acides aminés, *mcjB* et *mcjC* codent des enzymes nécessaires à la maturation du peptide et *mcjD* code un transporteur ABC de 580 acides aminés responsable de l'export et de l'immunité de la bactérie pour sa production de peptides antimicrobiens. Une fois dans le milieu extracellulaire, *Mccj25* est reconnu par le récepteur *FhuA* situé dans la membrane externe de la bactérie et cible l'ARN polymérase.

La structure de *McjD* d'*Escherichia coli* a été résolue en complexe avec l'AMPPNP (PDB: 4PLO, 2.7 Å) (Choudhury et al., 2014).





**Figure 49 : Comparaison des structures de McjD et Sav1866 en complexe avec l'AMPPNP.**

A) Structure en lasso de la microcine J25. B) Conformation outward-occluded de McjD-AMPPNP. En haut, observation des hélices transmembranaires du côté périplasmique. C) Dans les structures de Sav1866 et MsbA, les TM1 et 6 d'une sous-unité sont associés aux TMs 3 et 6 de l'autre.

Ce transporteur homodimérique (six hélices transmembranaires par monomère) adopte une conformation fermée aussi bien au niveau des TMDs que des NBDs (figure 49b). Les TMs 1 et 2 d'une sous-unité ne sont pas associés aux TMs 3 à 6 de l'autre, comme on a pu le voir précédemment dans les structures de MsbA et Sav1866 (figure 49c). Cet intermédiaire conformationnel entre les formes outward et inward facing est appelé outward-occluded. Le TM1 se trouve à proximité du TM6 et de son TM équivalent sur l'autre monomère. Le TM2 se situe à proximité du TM5 du monomère opposé. La cavité est fermée des deux côtés de la membrane et bordée de résidus chargés (six arginines), polaires et hydrophobes. La modélisation de Mccj25 à l'intérieur de la cavité suggère que les résidus Phe86, Asn134 et Asn302 sont impliqués dans la reconnaissance du peptide. La conformation des NBDs est identique à celle de Sav1866.

Des expériences de pontage intramoléculaire, réalisées sur McjD en détergent et reconstitué en protéoliposomes, confirment l'existence physiologique de la conformation outward occluded. La mutation de la leucine 53 en cystéine (figure 48b) induit, en absence



et présence de nucléotides, la formation d'un pont disulfure entre les boucles extracellulaires qui connectent les TM1-2 et 1'-2', ce qui n'est pas possible dans la conformation outward facing. Cette conformation fermée est stabilisée par trois ponts salins entre les résidus Lys80 (TM2) et Glu301 (TM6'), Arg141 (TM3) et Glu309 (TM6), Arg 195 (TM3) et Asp135 (TM4). A pH 4,5, la protonation des fonctions carboxylates rompt ces ponts salins et le transporteur est alors capable d'adopter une conformation outward facing en présence d'AMPPNP.

Une étude de FRET réalisée sur MsbA confirme que le transporteur est capable d'adopter une conformation dans laquelle les NBDs sont dimérisés et les TMDs fermés (Doshi et *al.*, 2013). Enfin, l'importateur de type I BtuCD en complexe avec l'AMPPNP adopte lui-aussi une conformation outward occluded (Korkhov et *al.*, 2012).

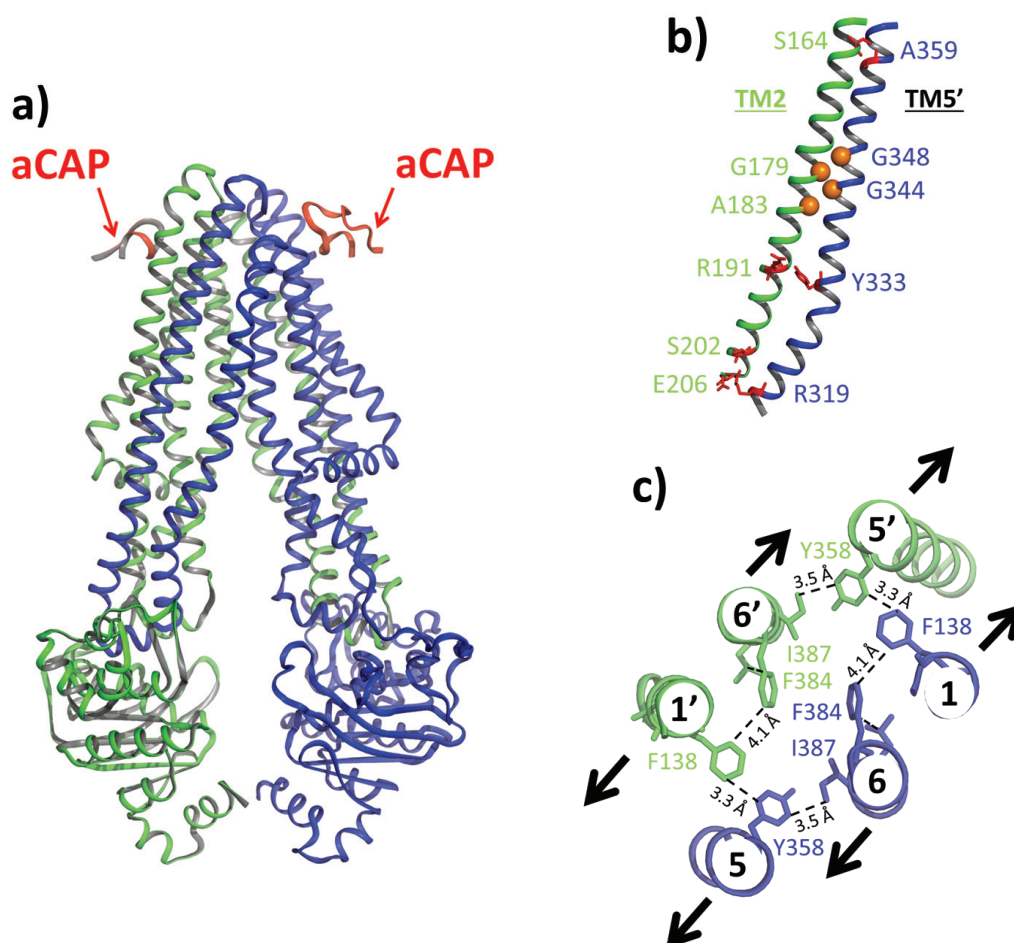
## (8) CmABCB1

La dernière structure d'un exportateur ABC à avoir été résolue est celle d'un homologue eucaryote de la P-gp humaine (hPg-p), CMD148C de l'algue thermophile *Cyanidioschyzon merolae* (CmABCB1) dans la forme apo (PDB: 3WME, 2.75 Å / 3WMF, 2.6 Å) et en complexe avec un peptide inhibiteur aCAP (anti-CmABCB1 peptide) (PDB: 3WMG, 2.4 Å) (Kodan et *al.*, 2014). CmABCB1 partage 35 % d'identité de séquence avec la P-gp humaine et adopte une architecture homodimérique (figure 50a).

Dans la forme apo, CmABCB1 est dans une conformation inward facing avec les NBDs séparés. Les hélices 2 et 5' (TMs 2 et 11 dans hP-gp), 5 et 2' (TMs 5 et 8 dans hP-gp) sont étroitement associées par le biais de plusieurs motifs glycine zipper (G179xxxA183 dans TM2 et G344xxxG348 dans TM5) (Kim et *al.*, 2005) et liaisons Hydrogène (figure 50b). Du côté périplasmique, la cavité est fermée par les hélices TMs 1, 6, 1', 6' associées aux TMs 5 et 5'. Un réseau d'interactions hydrophobes et de van der Waals entre les résidus aromatiques et hydrophobes (Tyr, Phe, Ile, Leu) stabilise la conformation inward facing (figure 50c). Des études de mutagenèse montrent que les résidus Tyr358 (TM5), Phe138 (TM1), Phe384 (TM6), Ile387 (TM6) et Leu388 (TM6) sont impliqués dans la fixation de la rhodamine 6G. Le résidu Tyr358 est conservé dans la P-gp humaine et de souris où il interagit avec les Inhibiteurs QZs59. Dans la structure de CmABCB1, Il se situe à proximité de Phe138 (TM1') et Ile387 (TM6) où sa liaison avec les substrats perturberait le réseau d'interactions hydrophobes et de van der Waals, entraînant le déplacement du TM5, la dissociation des TMs 1 et 6 et l'ouverture du transporteur vers le milieu extracellulaire.

Au niveau du feuillet interne de la bicouche lipidique, les TMs 4 et 6 constitueraient une voie d'accès latérale pour les substrats hydrophobes. Au milieu du TM4, les résidus Gly277 à Gly286 sont modélisés par une hélice déstructurée qui forme un coude à partir de la proline 271. La mutation de ce résidu par une alanine, qui est conservé chez tous les exportateurs ABC, diminue le transport de la rhodamine 6G et du bromure de tétraphénylphosphonium. La flexibilité de l'hélice TM4 serait critique pour l'ouverture de la cavité et l'entrée des substrats hydrophobes. Dans la P-gp de *C. elegans*, l'hélice TM10 qui correspond à TM4 dans CmABCB1 est également modélisée par une boucle déstructurée.

Les structures de CmABCB1 obtenues avec et sans inhibiteur sont identiques. Le peptide se fixe à la surface des TMs 2 et 6 au niveau du feuillet externe de la bicouche lipidique. Les résidus Lys162/Tyr163 (TM2) et Asn375/Asn378 (TM6) forment des liaisons Hydrogène respectivement avec Gln4/Trp7 et Asn9/Phe8 de l'inhibiteur. D'autres résidus (Phe258, Ile140 et Val141) forment des liaisons de van der Waals avec aCAP (Phe8, Ile5, Val6 et Trp 7).



**Figure 50 : Structure cristallographique de CmABCB1-aCAP.**

A) Interaction de CmABCB1 avec le peptide inhibiteur aCAP (anti-CmABCB1 peptide). B) Interaction entre les hélices TM2 et 5' par le biais de motifs glycine zipper et de liaisons hydrogènes. C) Vue du côté périplasmique des hélices TMs 1, 1', 5, 6 et 6'. Un réseau d'interactions hydrophobes et de van der Waals entre les résidus aromatiques et hydrophobes (Tyr, Phe, Ile, Leu) stabilise la conformation inward facing. La fixation de la rhodamine 6G entraînerait le déplacement du TM5, la dissociation des TMs 1 et 6 et l'ouverture du transporteur vers le milieu extracellulaire.

#### (9) Question ouverte sur les structures d'exportateurs ABC

Plusieurs critiques persistent concernant l'existence physiologique des conformations inward facing de MsbA, P-gp, CmABCB1 et ABCB10 (Gottesman et *al.*, 2009) (Jones et

Georges, 2014). La question est de savoir si la conformation apo avec les NBDs séparés représente une conformation physiologique, une conformation inactive qui n'existerait que transitoirement au cours du cycle de transport ou un artefact de cristallisation dû à la présence de molécules de détergent entre les TMDs ?

Le positionnement des NBDs serait non compatible avec plusieurs résultats biochimiques. *In vivo*, les concentrations d'ATP intracellulaires (3-5 mM) sont jusqu'à dix fois plus élevées que l'affinité des transporteurs ABC pour l'ATP ( $K_m$  ATP : 0.3-1 mM), ce qui suggère que ces transporteurs ont leurs NBDs saturés en nucléotides en permanence (Oldham et al., 2007). En 2001, Qu et Sharom montrèrent par fluorescence que les NBDs de la P-gp de hamster sont étroitement associés au cours du cycle catalytique (Qu et Sharom, 2001). Des études cinétiques sur P-gp suggèrent également que les NBDs restent toujours en contact et que les deux molécules d'ATP sont hydrolysées alternativement au cours du cycle de transport (Sauna et al., 2007; Siarheyeva et al., 2010). Loo et Clarke ont montré par une étude de réticulation covalente entre cystéines que la P-gp adopte dans la membrane une conformation fermée que ce soit en absence ou présence d'ATP (Loo, Bartlett et Clarke, 2010). En 2014, une étude par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (EPR) réalisée sur P-gp en membrane soutient que les NBDs ne se dissocient pas au cours du mécanisme de transport (van Wonderen et al., 2014). En 2011, le pontage intramoléculaire de deux résidus cystéine situés à l'extrémité C-terminale des NBDs de P-gp conserve une forte activité ATPasique en présence de substrats, ce qui suggère une absence de changements conformationnels au niveau des NBDs (Verhalen et al., 2011).

D'autres études confirment au contraire l'existence de la conformation apo ouverte des NBDs. Elle jouerait dans le cas des exportateurs ABC un important rôle physiologique. Leur flexibilité conformationnelle leur permettrait de s'adapter à la nature très variée des molécules qu'ils transportent. P-gp et MsbA exportent par exemple des substrats pouvant atteindre respectivement jusqu'à 4 kDa pour la  $\beta$ -amyloïde et 2.3 kDa pour le Kdo2-lipide A, un précurseur du lipopolysaccharide.

En 2004, une étude de réticulation covalente menée sur MsbA reconstitué en protéoliposomes (Buchaklian et al., 2004) montre que lorsque l'on mute le résidu phénylalanine 56 en cystéine (situé dans la boucle extracellulaire qui relie les TM1 et 2), un pont disulfure se forme spontanément. Bien que dans la conformation apo ouverte les deux cystéines restent encore trop éloignées pour former un pont disulfure (15 Å), ils sont beaucoup plus proches dans cette conformation que dans celle liant les nucléotides (30 Å). Seule une ouverture encore plus importante des NBDs permettrait de rapprocher ces deux résidus.

Une autre expérience de pontage intramoléculaire (Doshi et al., 2010) a été réalisée en 2010 sur des vésicules de membrane inversée contenant MsbA. Doshi et ses collaborateurs ont muté en cystéine une paire de résidus glutamate située à proximité de la boucle ICL2 qui relie les TMs 4 et 5. Dans la conformation outward facing, la distance entre ces deux résidus est de 6 Å (pont disulfure) alors que dans la conformation inward facing elle est de 55 Å. Ce mutant a permis de suivre les changements conformationnels de MsbA et mettre en évidence sa flexibilité structurale : les NBDs se dissocient en absence de nucléotides alors qu'ils se dimérisent en présence d'AMPPNP ou ADP-vanadate.

Des études de double résonance électron-électron (DEER) (Zou et *al.*, 2009; Zou et Mchaourab, 2010) réalisées sur MsbA en protéoliposomes montrent que les distances mesurées entre les NBDs en absence de nucléotides et présence d'ADP-vanadate sont en accord avec les structures cristallographiques.

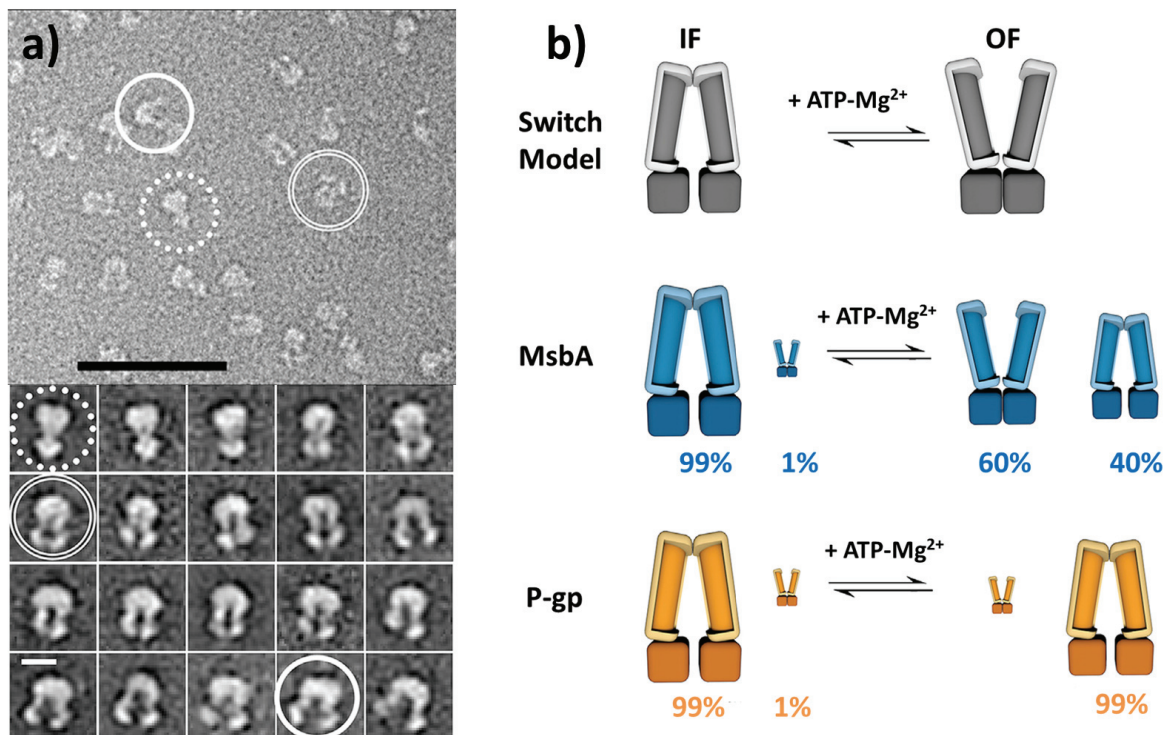
En 2012, des expériences d'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse réalisées sur BmrA en membrane et détergent confirment que le transporteur adopte deux conformations très différentes au cours du cycle de transport : l'une fermée qui résiste aux échanges hydrogène/deutérium et l'autre ouverte beaucoup plus sensible (Mehmood et *al.*, 2012).

En 2013, des études de dynamique moléculaire et de double résonance électron-électron menées sur P-gp en membrane montrent qu'en absence de nucléotide, le transporteur peut adopter une conformation encore plus ouverte que celles des structures cristallographiques (Wen et *al.*, 2013).

Une expérience de transfert de luminescence (LRET) réalisée sur MsbA reconstitué en liposomes montre que les NBDs se séparent complètement après hydrolyse de l'ATP, malgré une concentration de plusieurs mM d'ATP-Mg<sup>2+</sup> (Cooper et Altenberg, 2013).

En 2014, Loo et Clarke ont muté en cystéine les résidus alanine 80 et arginine 741 de la P-gp (situés dans les boucles extracellulaires 1 et 4) (Loo et Clarke, 2014). Dans la conformation ouverte, ces deux résidus sont en théorie suffisamment proches pour former un pont disulfure (6.9 Å) et éloignés dans la forme fermée (30.4 Å). Ils ont montré que le mutant A80C/R741C forme un pont disulfure qui inhibe l'activité ATPasique de P-gp en membrane.

En 2015, une remarquable étude par microscopie électronique a sans doute permis de clore le débat. Cette technique a permis de visualiser directement et de suivre les changements conformationnels de MsbA et P-gp induits par la fixation de nucléotides et de substrats (Moeller et *al.*, 2015) (figure 51a). En absence d'ATP, les transporteurs adoptent une conformation inward facing avec les NBDs séparés de 45 à 60 Å pour MsbA et 50 à 75 Å pour P-gp. Après une minute d'incubation avec 1 mM d'ATP-Mg<sup>2+</sup>, 60% de la population de MsbA se retrouvent dans une conformation outward facing et 42% dans une forme ouverte avec les NBDs séparés (figure 51b). De manière inattendue toutes les molécules de P-gp restent dans une conformation inward facing. La forme outward facing de P-gp est enrichie de l'ordre de 25% seulement et uniquement en présence d'ATP-vanadate plus substrats (vinblastine ou vérapamile). En revanche, la stabilisation de MsbA avec ATP-Vi ou l'utilisation du mutant E506 (qui fixe mais n'hydrolyse pas l'ATP) augmentent significativement le pourcentage de molécules se trouvant dans une conformation outward facing (95 et 86% respectivement). Ces résultats suggèrent que la forme inward facing de P-gp avec les NBDs séparés prédomine à l'intérieur de la cellule. Une concentration mM d'ATP n'est pas suffisante pour faire basculer la P-gp dans une conformation outward facing. La forme ouverte vers l'extérieur de la cellule nécessite pour P-gp de franchir une importante barrière énergétique. Cette forme n'existerait donc que transitoirement au cours du cycle de transport. Ceci explique pourquoi aucune structure de P-gp n'a été obtenue dans une conformation outward facing et justifie le fait que les structures d'ABCB10 en complexe avec des nucléotides ont été résolues dans une forme inward facing avec les NBDs séparés.



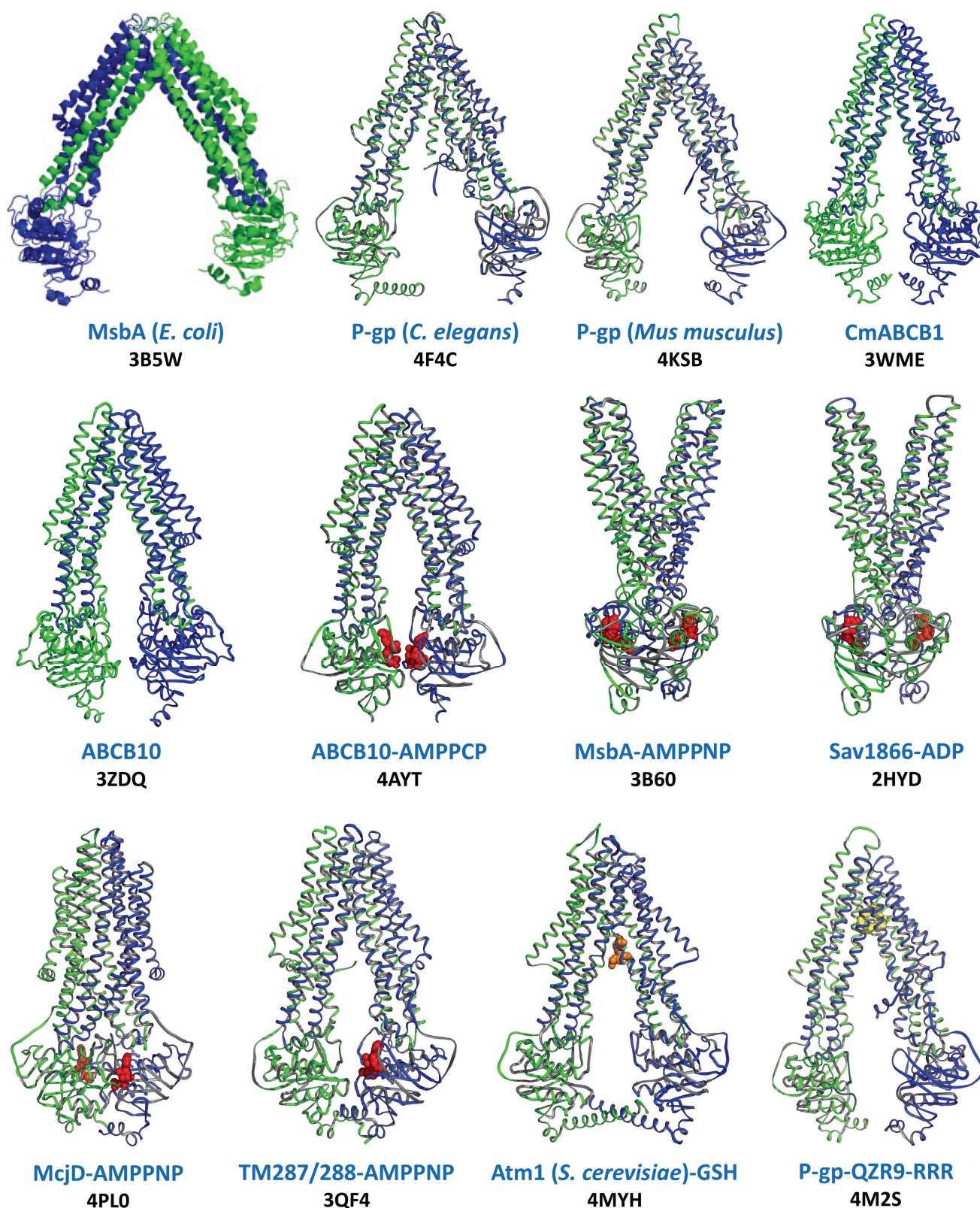
**Figure 51 : Changements conformationnels de MsbA et P-gp après hydrolyse de l'ATP.**  
D'après Moeller et *al.*, 2015.

A) Micrographies obtenues en microscopie électronique pour MsbA. Plusieurs conformations différentes sont observées : outward facing (cercle en pointillé), inward facing (double cercle), inward facing avec les NBDs très séparés (cercle plein). B) Les différents types de conformations observés pour MsbA et P-gp par microscopie électronique EM en absence et présence d'ATP-Mg<sup>2+</sup>.

## (10) Le mécanisme de transport

En 2007, après la parution des structures de MsbA et Sav1866 et sur la base de plusieurs données biochimiques, Linton proposa un mécanisme en quatre étapes de transport des substrats à travers la membrane appelé « ATP-switch » (Linton, 2007). Dans un premier temps, la fixation du substrat sur les TMDs modifie la conformation de ces derniers, et cette modification est transmise aux NBDs par le biais d'hélices couplantes qui peuvent alors fixer deux molécules d'ATP. La fixation d'ATP induit ensuite le passage de la conformation inward à outward facing et la libération du substrat de l'autre côté de la membrane. L'hydrolyse de l'ATP déstabilise le dimère de NBD et la libération de l'ADP et du phosphate inorganique restaure le transporteur dans sa conformation de haute affinité pour le substrat, ouverte vers le cytoplasme. Depuis 2013, le nombre de structures d'exportateurs ABC a presque triplé (figure 52).



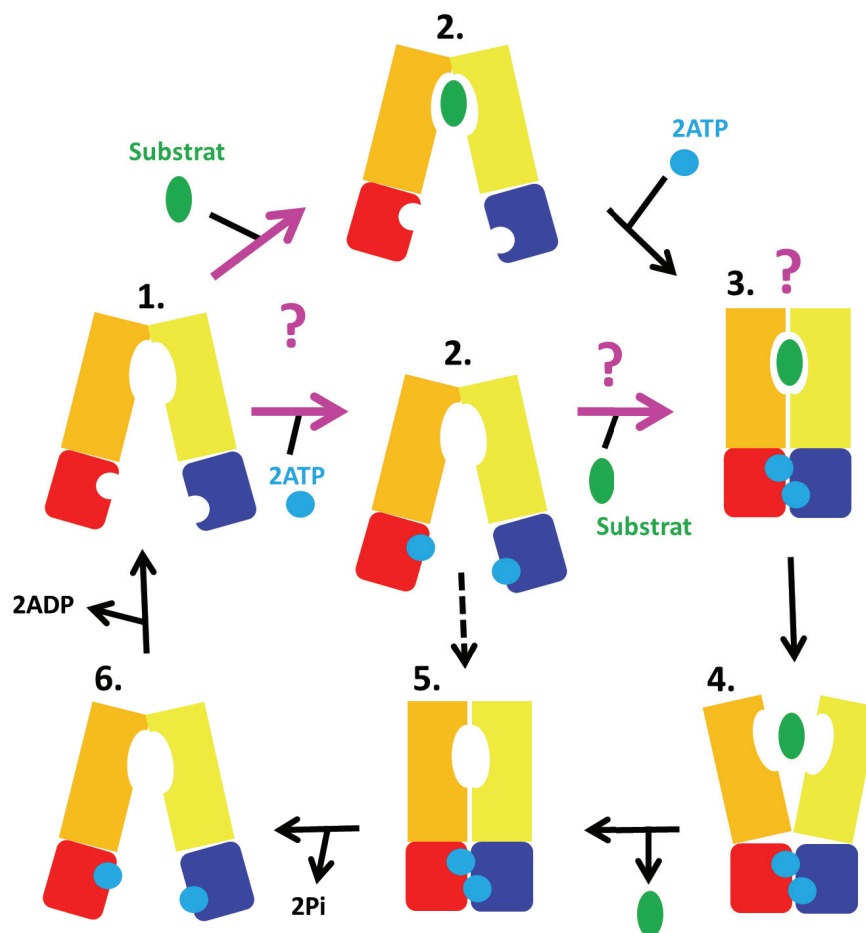


**Figure 52 : Les différentes structures cristallographiques d'exportateurs ABC.**

Ces structures ont permis de mieux appréhender ce mécanisme. La structure de McjD en complexe avec l'AMPPNP a mis en évidence un nouvel intermédiaire conformationnel entre les formes outward et inward facing appelé outward occluded qui intervient après la



libération du substrat et dans lequel la cavité formée par les TMDs est fermée de part et d'autre de la membrane (figure 52). Il est probable que cette conformation existe également en complexe avec une molécule de substrat à l'intérieur de la cavité lors du passage de la forme inward à outward facing. Les structures d'ABCB10 ont permis de montrer que les nucléotides peuvent se fixer en absence de substrat transporté, ce qui est en accord avec le fait que les transporteurs ABC possèdent une activité ATPasique dite basale, mesurée en absence de substrats exogènes.



**Figure 53 : Le mécanisme hypothétique de transport des exportateurs ABC homodimériques.**

Les points d'interrogation concernent les étapes du mécanisme de transport qu'il reste encore à éclaircir : Qui du substrat ou de l'ATP se fixent en premier ? La conformation inward facing en complexe avec les nucléotides peut-elle fixer des substrats ? aucune structure n'a été obtenue en complexe à la fois avec des nucléotides et un agent anticancéreux. La flèche en pointillés représente l'activité basale du transporteur en absence de substrats. Les molécules de substrat et de nucléotides sont colorées en vert et en bleu.

Etant donné qu'à l'intérieur de la cellule, les transporteurs ont leurs NBDs saturés en nucléotides en permanence, la fixation du substrat pourrait intervenir après la fixation de l'ATP (figure 53). Or, comme le montre les structures d'ATM1 et P-gp résolues en complexe avec du GSH et des inhibiteurs, les ligands peuvent se fixer au domaine membranaire en absence de nucléotides. Il se pose donc la question de savoir qui du substrat ou des nucléotides se fixe en premier au cours du cycle de transport ?

Le modèle ATP switch, dans lequel les deux molécules d'ATP se fixent simultanément et sont ensuite hydrolysées de manière séquentielle, est en accord avec toutes les nouvelles structures cristallographiques d'exportateurs ABC homodimériques. En revanche, Il apparaît évident que les exportateurs ABC hétérodimériques adoptent un mécanisme différent. Les structures de TM287/288 apo et en complexe avec l'AMPPNP montrent que les NBDs restent associés en permanence (constant contact model) et qu'une molécule d'ATP peut rester fixée au site dégénérée pendant plusieurs cycles de transport.

Comme nous venons de le voir, certains points du mécanisme ATP switch restent pour l'heure encore controversés. Il est nécessaire de déterminer d'autres structures de transporteurs ABC en particulier en complexe avec des substrats exogènes de type anticancéreux. L'obtention d'intermédiaires conformationnels en complexe simultanément avec des substrats et des nucléotides contribuera également à compléter notre compréhension du mécanisme. C'est dans cet objectif que le travail présenté dans cette thèse a été réalisé.

Mais pour réaliser une telle étude, il faut surmonter les difficultés de cristallisation des protéines membranaires, qui sont décrites dans la partie qui suit.

### **III. CRISTALLISER UNE PROTEINE MEMBRANAIRE : UN DEFI.**

Les protéines membranaires sont constituées d'acides aminés hydrophobes, conduisant à leur insertion dans les membranes biologiques, constituées par une bicouche phospholipidique. Elles représentent environ 25 % des protéomes (Krogh et *al.*, 2001) et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Sur le plan médical, elles constituent 60 % des cibles thérapeutiques (Arinaminpathy et *al.* 2009). A ce jour, 533 structures uniques de protéines membranaires ont été résolues d'après le site « Membrane Proteins of Known Structure » (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>) qui recense les protéines de même type appartenant à des espèces différentes. Ce chiffre représente moins de 1 % des structures tridimensionnelles de protéines solubles. Il illustre parfaitement le défi et l'enjeu considérable que représente la cristallisation des protéines membranaires.

La première structure d'une protéine membranaire, celle du centre réactionnel P680 de la bactérie *Rhodospseudomonas viridis*, a été résolue en 1985 (Deisenhofer et *al.*, 1985). Il a fallu attendre 2002 pour que la première structure tridimensionnelle d'un transporteur ABC soit obtenue, celle de l'importateur de vitamine B<sub>12</sub> BtuCD (Locher et *al.*, 2002). Depuis 2013, l'émergence spectaculaire de nouvelles structures a permis de dégager certaines règles et développer de nouvelles approches méthodologiques pour faciliter leur étude par cristallographie aux rayons X.

Ainsi, dans cette partie, nous décrirons les deux principales difficultés qui peuvent se présenter dans le cas des protéines membranaires, à savoir leur surexpression et leur maintien en solution à l'aide détergents de la solubilisation jusqu'à la cristallisation. Nous présenterons les solutions et les techniques qui peuvent être envisagées pour les surmonter.

## A. LA SUREXPRESSION

La surexpression des protéines membranaires constitue le premier obstacle à surmonter (Borges-Walmsley et *al.*, 2003). La cristallisation nécessite une grande quantité de protéine, bien au-delà du mg, or elles restent difficiles à exprimer et à purifier. Le choix du système d'expression est souvent critique pour les transporteurs ABC. Ces derniers sont en effet souvent toxiques pour la cellule ou mal repliés lorsqu'ils sont surexprimés, à cause notamment de la différence de composition lipidique entre la membrane d'origine et celle de l'organisme hôte. Le développement de nouvelles souches spécialisées comme BL21, C41 et C43 d'*Escherichia coli* (Miroux et Walker, 1996) a permis d'améliorer significativement leur expression et d'obtenir des rendements de surexpression des protéines membranaires compris entre 5 et 50 % du total des protéines exprimées (Putman et *al.*, 2000). Il est aussi souvent nécessaire d'adapter les conditions de culture et d'induction (température, durée).

Dans le cadre des transporteurs ABC, la bactérie *E. coli*, peu onéreuse et facilement modifiable génétiquement, est particulièrement bien adaptée pour l'expression des exportateurs procaryotes (Sav1866, MsbA, Atm1 et McjD). En revanche, elle n'effectue pas les modifications post-traductionnelles comme la glycosylation nécessaire aux protéines eucaryotes.

La P-gp de *C. elegans*, *mus musculus* et CmABCB1 de *C. merolae* ont ainsi été surexprimées dans *Pichia pastoris*. Une étude sur la P-gp de souris a montré que l'optimisation des codons rares pour le système d'expression de levure a permis d'augmenter les rendements d'expression et d'obtenir une protéine plus stable (Bai et *al.*, 2011). Cette construction a d'ailleurs permis d'obtenir les structures de P-gp de 2013 (Ward et *al.*, 2013). Il est souvent admis que la glycosylation induit une grande hétérogénéité de structure, nuisible pour la cristallisation. Les structures de P-gp de *Mus musculus* ont été obtenues après mutation des sites potentiels de N-glycosylation. Les structures de *C. elegans* et CmABCB1 ont en revanche été résolues dans leur forme glycosylée, ce qui démontre que la présence de sucres ne nuit pas forcément à la formation des cristaux.

Le transporteur humain ABCB10 a été surexprimé en cellules d'insectes Sf9. Ce système est l'un des plus utilisés pour l'expression de protéines recombinantes eucaryotes. Il est basé sur l'insertion du gène à exprimer dans le génome d'un baculovirus vecteur et sur l'infection de cellules en culture. Les niveaux d'expression sont assez élevés et la plupart des modifications post traductionnelles sont effectuées, y compris les N- et O- glycosylations.

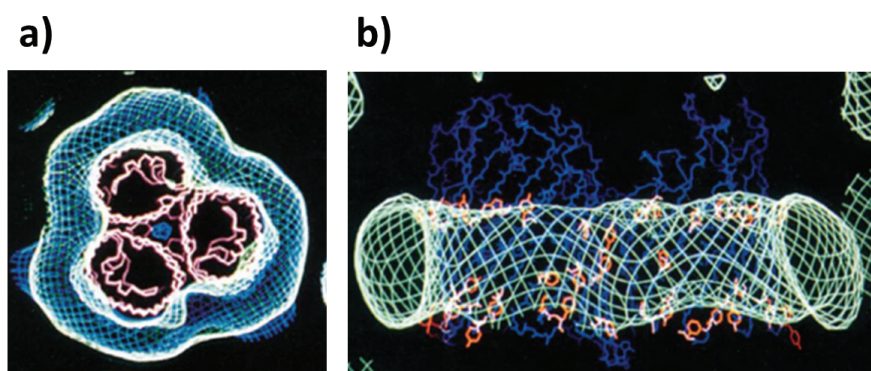
## B. LES DETERGENTS

Une autre difficulté est d'extraire les protéines de leurs membranes d'origine et de les maintenir en solution à l'aide de détergents. Les lipides jouent un rôle essentiel dans la structuration des transporteurs en exerçant une pression latérale autour du domaine membranaire des protéines et qu'ils stabilisent de cette façon. Leur substitution par des détergents tend à déstabiliser la protéine car ces derniers s'échangent nettement plus rapidement. Les protéines ABC perdent ainsi souvent leur activité lorsqu'elles sont purifiées et la diminution significative de leur stabilité membranaire est souvent nuisible pour la cristallisa-

tion. Plusieurs structures cristallographiques de protéines membranaires ont été résolues en complexe avec des lipides (Shevchenko et *al.* 2014; Laganowsky et *al.*, 2014; Koshy et *al.*, 2013; Lemieux et *al.*, 2003), ce qui démontre leur importance à la fois structurale et fonctionnelle.

### Généralités

Les détergents sont des molécules amphiphiles constituées d'un groupement hydrocarboné hydrophobe et d'une extrémité hydrophile qui permettent à la fois une interaction avec la région hydrophobe des protéines et le maintien en solution du complexe protéine-détergent ainsi formé. Les détergents ont la propriété de former des micelles au-delà d'une concentration appelée concentration micellaire critique (CMC). A des concentrations inférieures à la CMC, seuls des monomères sont observés alors qu'à des concentrations supérieures à la CMC, le détergent se retrouve dans trois états possibles : sous forme monomérique, micellaire ou associé à la protéine au sein de complexes protéine-détergent (PDC). Le centre hydrophobe de la micelle se lie aux régions hydrophobes des protéines pour former une « ceinture ou bouée » de détergent, comme illustré dans la figure 54 ci-dessous.



**Figure 54 : Illustration de la bouée de détergent autour des protéines.**

D'après Pebay-Peyroula et *al.*, 1995.

Observation de la ceinture de détergent autour du trimère d'OmpF par diffraction de neutrons.

La CMC dépend de plusieurs paramètres comme la structure du détergent (elle diminue avec le nombre de carbones de la chaîne alkyle, Prive et *al.*, 2007), la force ionique (l'ajout de sel diminue la CMC et augmente la taille des micelles) et la température (des températures élevées entraînent une légère augmentation de la CMC, Molina-Bolivar et *al.*, 2007). Les détergents sont classés en quatre groupes principaux en fonction des caractéristiques de leur extrémité hydrophile. Les dénominations et propriétés de quelques-uns de ces détergents sont rappelées dans le tableau 8 ci-après.

- ⊕ Les détergents **non ioniques**, comme le triton X-100, le DDM, et l'OG sont composés d'une extrémité hydrophile non chargée. Ils présentent une CMC plus faible que les détergents ioniques. Ils sont non dénaturants et doux car ils rompent les interactions

Nom	Abrév.	Type <sup>A</sup>	Structure	g/mol	Micelle Ag <sup>B</sup> /kDa	CMC <sup>C</sup> (mM), H <sub>2</sub> O	1%, mM
n-Octyl-β-D-glucopyranoside	OG	N		292,4	27 8	18	34
n-dodecyl-β-D-maltopyranoside	DDM	N		510,6	98 70	0,17	19
n-undecyl-β-D-thiomaltopyranoside	UTM	N		513	106 55	0,21	19
Lauryl maltose neopentyl glycol	LMNG	N		1005	-	0,01	10
6-cyclohexyl-1-hexyl-β-D-maltoside	CYMAL 6	N		508,5	63 -	0,56	20
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate	CHAPS	Z		614,9	10 6,1	8	16
Sodium cholate	Cholate	I		431	2-3 1,3	10	23
Lauryldimethylamine N-oxide	LDAO	Z		229,4	76 20	1,5	44
Sodium dodecylsulfate	SDS	I		288	84 24	7	35
Polyethylene glycol tertoctylphenyl ether	Triton x100	N		647	75-160 90	0,5	15
Fos choline 12	FC12	Z		352	54 -	1,5	28
Fos choline 16	FC16	Z		408	178 -	0,013	26
Octaethylene glycol monododecyl ether	C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	N		539	123 66	0,09	19

**Tableau 8. Structure et caractéristiques des principaux détergents utilisés pour la solubilisation, purification et cristallisation des protéines membranaires.**

Abr = abréviation ; g/mol = masse molaire ; cmc = concentration micellaire critique ; Micelle (Ag/kDa) = nombre d'aggrégation et taille de la micelle en kDa ; 1%, mM = la concentration molaire correspondante à 1% du détergent.

lipide-protéine mais pas les interactions protéine-protéine. Ils sont très utilisés pour résoudre les structures cristallographiques de protéines membranaires.

- ⊕ Les détergents **zwitterioniques**, comme le LDAO, la FC12 et 16, sont plus dénaturants que les détergents non ioniques, mais plusieurs ont été utilisés avec succès pour résoudre la structure cristallographique de protéines membranaires (Kefala et *al.*, 2010; Wiseman, Kilburg et *al.*, 2014).
- ⊕ Les détergents **ioniques** comme le SDS sont très agressifs. Ils sont efficaces pour solubiliser les protéines membranaires mais sont très souvent dénaturants et ne sont donc pas utilisés dans les études cristallographiques.
- ⊕ Les composés de type **biliaires** comme le CHAPS ou le cholate forment une classe de détergents à part. Ils sont assez doux et forment de petites micelles, présentant un nombre d'aggrégation assez faible (nombre moyen de molécules de détergent formant une micelle). Ils sont assez peu utilisés pour les études cristallographiques.

Le choix du type de détergent est très important compte tenu de son rôle crucial dès l'étape de solubilisation jusqu'à la cristallisation. Un criblage de différents types de détergent (longueur de la chaîne hydrophobe, nature du groupe polaire, CMC...) peut permettre de trouver la molécule adéquate pour chacune des étapes de préparation et de cristallisation de la protéine.

Les protéines membranaires sont en général purifiées avec des détergents possédant une chaîne hydrophobe alkyle de douze carbones et un groupement polaire de type non ionique (maltoside ou glucoside) ou zwitterionique. Au cours de la purification, il peut être échangé au profit d'un détergent à la chaîne aliphatique plus courte, favorisant les contacts protéine-protéine. C'est par exemple le cas de certains transporteurs ABC comme la P-gp de *mus musculus* et CmABCB1 qui après avoir été extrait respectivement en triton X-100 et C<sub>12</sub>E<sub>9</sub> ont été purifiés en DDM-cholate et decylmaltoside (DM).

Les trois détergents les plus utilisés pour la cristallisation des protéines membranaires sont le n-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM), puis l'octylglucoside (OG) et le decylmaltoside (DM) (Newstead et *al.*, 2008). Dans le cadre des exportateurs ABC (tableau 9), le DDM a été utilisé pour les transporteurs MsbA, Atm1 de *S. cerevisiae*, McjD, TM287/288 et ABCB10. Atm1 de *N. aromaticivorans* a été cristallisé dans une micelle mixte de détergent composée de LDAO-OG-CHAPSO-HEGA 11. Sav1866 et P-gp de *C. elegans* ont été obtenus en présence respectivement de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> et undecyl-thiomaltopyranoside (UTM).

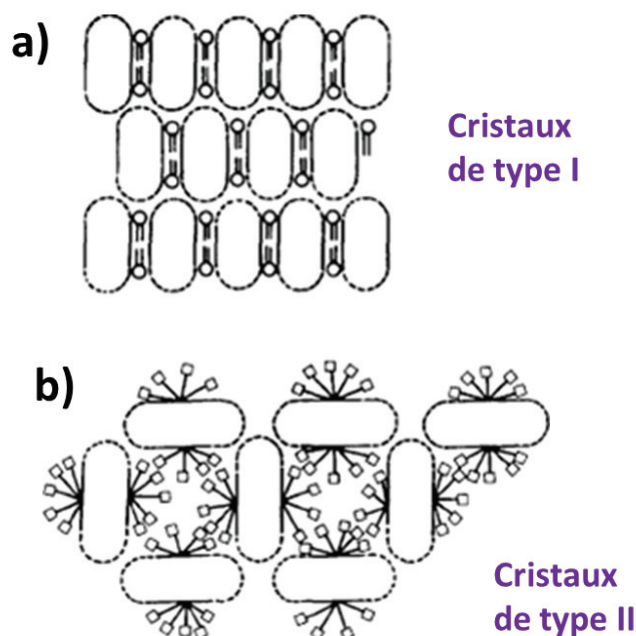


Tableau 9. Les différentes conditions d'expression, purification et cristallisation des exportateurs ABC.

Transporteur ABC	Système expression	°C (d)	Détergent extraction	Détergent purification n	Détergent cristallisation n	[BmrA] Prot/préc.	°C	Méthode	Condition
Sav1866	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	37°C (2h)	1% C12E8 0,1% β-DDM	C12E8	C12E8	15 mg/ml 2,1	10°C	Goutte assise	20 % PEG 6000, 50 mM <u>Li<sub>3</sub>-citrate</u> , 150 mM <u>K<sub>3</sub>-citrate</u> , 100 mM <u>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></u> et 3 mM <u>MgCl<sub>2</sub></u> .
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	37°C (NC)	1% β-DDM	β-DDM	β-DDM	15 mg/ml 3,1	4°C	Goutte assise	20 mM <u>Tris HCl</u> pH 7,5, 100-200 mM <u>citrate</u> (pH 4,8-5,4), 15-20 % <u>PEG 400</u> , 80-120 mM <u>LiSO<sub>4</sub></u> .
P-gp <i>C. elegans</i>	<i>P. pastoris</i> SMD1163	28°C (24h)	1% β-DDM	β-DDM	UTM	10 mg/ml 1,1	4°C	Goutte assise	100 mM <u>Hepes</u> pH 6,6-7,2, 200 mM <u>sodium malonate</u> , et 19-22 % <u>PEG 2000 MME</u> .
P-gp <i>Mus musculus</i>	<i>P. pastoris</i> GS115	NC (ON)	4,5% triton	β-DDM Na <u>cholate</u>	β-DDM Na <u>cholate</u>	10 mg/ml 1,1	4°C	Goutte assise	50 mM <u>Tris</u> pH (7,3-7,5), et 16,8-17,6 % <u>PEG 350 MME</u> .
TM287/288	<i>E. coli</i> C43 (DE3)	NC (NC)	1,5% β-DDM	β-DDM	β-DDM	16 mg/ml 1,1	20°C	Goutte assise	29% <u>PEG 400</u> , 50 mM <u>Na-cacodylate</u> pH 5,5, 100 mM <u>CaCl<sub>2</sub></u> .
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9)	27°C (72h)	1% β-DDM 0,05% <u>cardiolipine</u>	β-DDM <u>Cardiolipine</u>	β-DDM <u>Cardiolipine</u>	8 mg/ml 1,1	20°C	Goutte assise	100 mM <u>NaCl</u> , 100 mM <u>glycine</u> pH 9,5, 30-36% <u>PEG 300</u> .
Atm1 <i>N. aromaticivorans</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	NC (NC)	0,25% <u>LDAO</u> , OG, <u>CHAPSO</u> , HEGA-11	<u>LDAO</u> , OG, <u>CHAPSO</u> , HEGA-11	<u>LDAO</u> , OG, <u>CHAPSO</u> , HEGA-11	10 mg/ml 1 : 1	4°C	NC	100 mM <u>sodium citrate</u> pH 5,4, 200 mM <u>magnésium acétate</u> , 12% <u>PEG 5000</u> .
Atm1 <i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	37°C (3h)	0,5% β-DDM	β-DDM	β-DDM	7 mg/ml 1 : 1	10°C	Goutte suspendue	100 mM <u>Mes</u> pH 6,5, 200 mM <u>ammonium sulfate</u> , 35% <u>pentaerythritol ethoxylate</u> .
MclD	<i>E. coli</i> C43 (DE3)	25°C (ON)	1% β-DDM	β-DDM	β-DDM	10 mg/ml 1 : 1	20°C	NC	100 mM <u>sodium citrate</u> pH 5,5, 45 mM <u>NaCl</u> , 26% <u>PEG 200</u> .
	<i>P. pastoris</i> SMD1163	30°C (10h)	1% C <sub>12</sub> E <sub>9</sub>	C <sub>12</sub> E <sub>9</sub>	DM	10 mg/ml 1 : 1	20°C	Goutte assise	100 mM <u>magnésium nitrate</u> , 14-16% <u>PEG 2000 MME</u> .

## La cristallisation des protéines membranaires

L'étape de cristallisation est très problématique en raison notamment du désordre causé par les molécules de détergent. La forme et la taille de la ceinture de détergent peuvent influencer la qualité de l'empilement cristallin. En 1997, Ostermeier et Michel ont défini deux grandes catégories de cristaux des protéines membranaires :



**Figure 55 : Les deux principaux types de cristaux des protéines membranaires (Ostermeier et Michel, 1997).**

⊕ Les cristaux de type I (figure 55a) correspondent à l'empilement tridimensionnel de cristaux 2D, grâce aux interactions entre les parties polaires des protéines. Les surfaces hydrophobes de la protéine sont en interaction directe. Ils sont souvent obtenus à l'aide de la cristallisation en phase cubique.

⊕ Les cristaux de type II (figure 55b) sont obtenus avec les techniques classiques de cristallisation. Les protéines interagissent via leur surface polaire. La ceinture de détergent fait partie intégrante du réseau cristallin et limite les contacts protéine-protéine. Ces derniers dépendent du type de détergent et de la longueur de sa chaîne carbonée, ce qui explique sa très forte influence sur la cristallisation des protéines membranaires. Ces cristaux contiennent beaucoup de solvant

## La quantification du détergent

La quantité de détergent liée à la protéine au sein du PDC peut être très importante. Il peut représenter jusqu'à la moitié de la masse totale du PDC, ce qui explique la forte influence du détergent sur le niveau d'agrégation, la cristallogenèse, la stabilité du cristal et son degré de diffraction (Ostermeier et Michel, 1997). Plusieurs études ont montré que le

succès de cristallisation des protéines membranaires dépend grandement du ratio protéine-détergent (Prince et Jia, 2012, Dahout-Gonzalez et *al.*, 2003). Le volume des micelles tend à limiter les contacts protéine-protéine, ce qui nuit à l'édification de l'empilement cristallin (Wiener et *al.*, 2004).

Présent à la fois sous forme libre et associé à la protéine, il n'est jusque-là pas possible de déterminer la concentration réelle de détergent une fois ajouté car celle-ci dépend alors de celle de la protéine : plus cette dernière est élevée plus la concentration de détergent augmente. La nature des solutés, notamment les sels, la température, le pH, modulent aussi cette concentration.

Après purification, la protéine est en général concentrée plusieurs fois. Mais les concentrateurs à membrane poreuse qui sont utilisés en majorité aujourd'hui conduisent également à la concentration des micelles de détergent libre (Shi et *al.*, 2008). Il n'est en effet pas toujours possible d'utiliser des systèmes de concentration avec des seuils de coupure supérieurs à la taille des micelles et inférieurs à celle du PDC. La concentration réelle de détergent présent dans le milieu est alors totalement inconnue. Or, en vue du succès et de la reproductibilité des expériences de cristallisation, il est indispensable d'avoir cette information.

Une grande variété de techniques a été proposée pour quantifier les détergents : le marquage radioactif (Le Maire et *al.*, 1983), les dosages colorimétriques (Ames et *al.*, 1966; Urbani et *al.*, 2005; Prince et Jia, 2012), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (DaCosta et *al.*, 2002), la chromatographie en couche mince couplée à un densitomètre (Eriks et *al.*, 2003; Barret et *al.*, 2013), la chromatographie d'exclusion couplée à un réfractomètre et diffusion de lumière (Strop et *al.*, 2005; Slotboom et *al.*, 2008), la mesure d'angle de contact d'une goutte (Kaufmann et *al.*, 2006), la chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par ionisation de flamme (Shi et *al.*, 2008) ou spectrométrie de masse (Shi et *al.*, 2009) et l'électrophorèse capillaire couplée à la spectroscopie UV (Liu et *al.*, 2004). Les détails concernant le principe, la limite de détection, les avantages et les inconvénients de chaque méthode sont répertoriés dans le tableau 10 ci-après. Aucune de ces techniques ne permet de doser un détergent quelconque (que ce soit seul ou en mélange), en routine et rapidement. La technique du diméthylphénol/acide sulfurique, basée sur le dosage colorimétrique des sucres, semble la plus adaptée pour une analyse de routine. Elle est rapide (1-2h), simple et nécessite un faible volume d'échantillon ( $\approx 10 \mu\text{l}$ ). Mais elle se limite aux détergents glycosidiques (utilisés dans près de 60 % des succès de cristallisation) et n'est pas applicable aux mélanges de détergents. Le choix de la technique à utiliser dépend donc grandement des besoins de l'expérimentateur.

Tableau 10. Les différentes méthodes de dosage des détergents.

Méthode	Principe	Classe de détergent	Limite de détection	Avantages	Inconvénients	Ref.
2,6-diméthylphénol-acide sulfurique	Basé sur le dosage colorimétrique des sucres (Dubois et <i>gl.</i> , 1956). La réaction du 2,6-diméthylphénol avec l'acide sulfurique donne un produit coloré dont l'absorbance à 510 nm est proportionnel à la concentration des détergents glycosidiques.	Maltoside Glucoside	DDM 200 µM	Rapide (≈ 1-2h) Sensible Faible volume d'échantillon	Produits dangereux Limitée aux détergents glycosidiques Mélanges de détergent Interférence avec glycérol et protéines glycosylées.	Prince et Jia, 2012
Molybdate d'ammonium-acide ascorbique	Dosage colorimétrique des phosphates avec un réactif dit combiné (molybdate d'ammonium, acide ascorbique et acide sulfurique). Lecture à 820 nm.	Fos-choline	FC12 1 mM	Assez rapide (3h) Faible volume d'échantillon	Produits dangereux Limitée aux détergents foscholine Interférence avec protéines phosphorylées.	Ames 1966
Acide sulfurique	La réaction de l'acide sulfurique avec le groupement hydroxyle du cholate ou du CHAPS donne un produit coloré qui absorbe à 389 nm.	CHAPS cholate	CHAPS 250 µM	Simple et très rapide sensible	Classe spécifique de détergents, peu utilisés en cristallisation.	Urbani 2005
Marquage radioactif	La radioactivité de l'échantillon est mesurée avec un compteur à scintillation en milieu liquide.	DDM, C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> , CHAPS, triton	DDM 60 µM	Aucune interférence Précise, sensible et très spécifique	Couteux et pas utilisable en routine Pas d'équivalents radioactifs pour tous les détergents.	Le Maire 1983
Spectroscopie FTIR infrarouge	A chaque détergent correspond un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques dans la région 1,200-900 cm <sup>-1</sup> . L'aire du signal est mesurée et comparée à une série de standards pour déterminer le ratio protéine/détergent de la solution.	OG, DM, C12E8, cholate	OG 100 mM	Très rapide	Non applicable pour les mélanges de détergent. Équipement très spécifique (montage de réflexion totale atténuée). Mise au point pour chaque détergent	DaCosta 2002
Chromatographie en couche mince	Détergents séparés par chromatographie en couche mince et révélés à la vapeur d'iode. La densité optique des taches, mesurée par un densitomètre laser, est proportionnelle à la quantité de détergent.	OG, DM, DDM, FC12, LDAO, C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> , C <sub>8</sub> E <sub>5</sub>	DDM 100 mM	Quantification de plusieurs détergents en mélange	Migration identique de certains détergents qui ne sont donc pas distinguables. Sous-estimation de la quantité de détergent fixée à la protéine et surestimation du détergent libre. Interférence avec glycérol.	Ericks 2003
HPTLC	L'éluant est un mélange dichlorométhane/méthanol/acide acétique qui permet de séparer les détergents glycosidiques proches structuralement. Nouvelle Révélation avec un mélange acide sulfurique/sulfate de cuivre qui augmente de dix fois la sensibilité par rapport à la méthode CCM.	Maltosides Glucosides	DDM 50 µM	Sépare les détergents glycosidiques proches structuralement	Optimisée seulement pour les détergents glycosidiques	Barret 2013



Chromatographie d'exclusion couplée à un réfractomètre et diffusion de lumière multi angles (SEC-MALLS)	La protéine et la micelle de détergent sont séparées par chromatographie d'exclusion. L'intégration du pic d'indice de réfraction du détergent libre à différentes concentrations permet de tracer une courbe standard linéaire.	DDM, FC14, LDAO, C <sub>12</sub> E <sub>9</sub>	FC14 1 mM	Applicable à plusieurs classes de détergent	Mesure seulement la quantité de détergent libre. Non applicable aux mélanges de détergent. Interférence avec le sel. Concentration de l'échantillon avant cristallisation, ce qui va modifier à nouveau le ratio protéine-détergent.	<a href="#">Stroob</a> 2005 <a href="#">Slotboom</a> 2008
Mesure d'angle d'une goutte	Les détergents diminuent la tension superficielle à la surface d'un fluide. Les variations de l'angle de contact entre la surface solide et la goutte à différentes concentrations de détergent permettent de déterminer une droite d'étalonnage.	OG, triton, FC12, C <sub>12</sub> E <sub>9</sub> , DDM, LDAO, CHAPS	DDM 100 µM	Précis <a href="#">Très rapide</a>	Matériel très spécifique Non applicable aux mélanges de détergent Interfère avec le glycérol et les lipides	Kaufmann 2006
Chromatographie en phase gazeuse (GC)	Détection par ionisation de flamme (FID). Une courbe de régression quadratique permet de corréler l'air du pic à différentes concentrations de détergent.	DM, DDM, LDAO, FC12	DDM 1 mM	Pas d'interférence avec les composés du tampon	Longue à mettre en œuvre Pas adaptée à des mesures de routine	<a href="#">Shi</a> 2008
	Détection par spectrométrie de masse (MS). Les molécules de détergents sont ionisées par un faisceau d'électrons. L'intégration du pic de base (ion le plus abondant du spectre de masse) à différentes concentrations de détergent permet d'obtenir une courbe standard de régression quadratique. Même sensibilité que FID.			Adaptée aux mélanges de détergents		<a href="#">Shi</a> 2009
Electrophorèse capillaire couplée à la spectroscopie UV	Les détergents cationiques sont détectés indirectement par un chromophore présent dans le tampon. Le passage des cations se traduit par une diminution de l'absorbance du chromophore et un pic négatif. Nécessite des standards internes.	Cationiques	NC	Bonne résolution	Longue à mettre en œuvre Limitée aux détergents cationiques	Liu 2004
Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse	Les molécules de détergent sont séparées des protéines par LC puis ionisées par un faisceau d'électrons. L'intégration de l'air des pics d'adduits dominants à différentes concentrations permet d'obtenir une courbe standard linéaire.	OG	OG 40 µM	Sensibilité	Etalonnage de chaque détergent Analyse complexe des spectres Pas adapté à une analyse en routine	Deng 2001

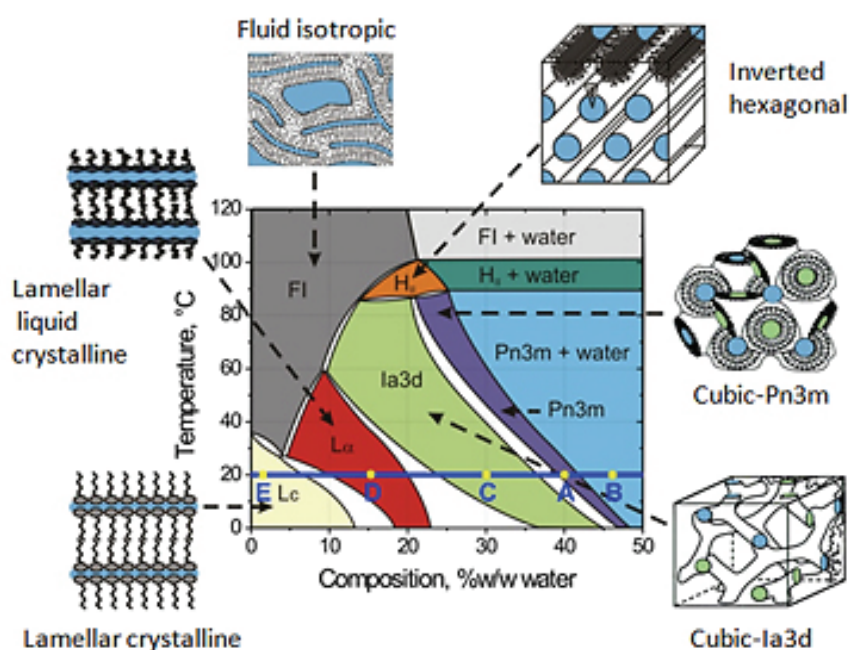
## Les alternatives à la cristallisation en détergent

Dans un environnement de détergent, les protéines sont en général instables. Enlever l'excès de détergent n'est donc pas toujours suffisant pour obtenir des cristaux. L'ajout de lipides peut en revanche grandement faciliter la cristallisation des protéines membranaires (Hattori et *al.*, 2012). Plusieurs nouvelles techniques de cristallisation plus spécifiques aux protéines membranaires sont ainsi apparues ces dernières années. Elles partent du principe qu'une protéine membranaire devrait cristalliser plus facilement dans un environnement similaire à son milieu naturel. Ces méthodes utilisent des lipides qui vont soit s'auto-associer en mésophase (phase lipidique cubique), soit former des bicelles en présence de détergents.

La cristallisation en phase cubique a été initiée en 1996 par l'équipe de Rosenbusch (Landau et Rosenbusch, 1996). Elle se base sur des monophasés formés d'un mélange eau-monoacylglycérol (comme la monoléine ou la monopalmitoléine) et ne comportent aucun détergent (Qiu et Caffrey, 2000). Les proportions sont typiquement 50-80% (w/w) de lipides et 50-20% d'eau. Les phases cubiques sont de deux types selon la manière dont s'empilent les lipides dans les trois dimensions (figure 56) :

⊕ Les cubiques micellaires sont des micelles placées côte à côte, aux sommets de cubes qui s'empilent dans les trois dimensions.

⊕ Les phases bicontinues, où une couche continue de lipides se replie pour exposer ces têtes hydrophiles à un compartiment aqueux.



**Figure 56 : Diagramme de phase et structures formées par un mélange monoléine/eau.**

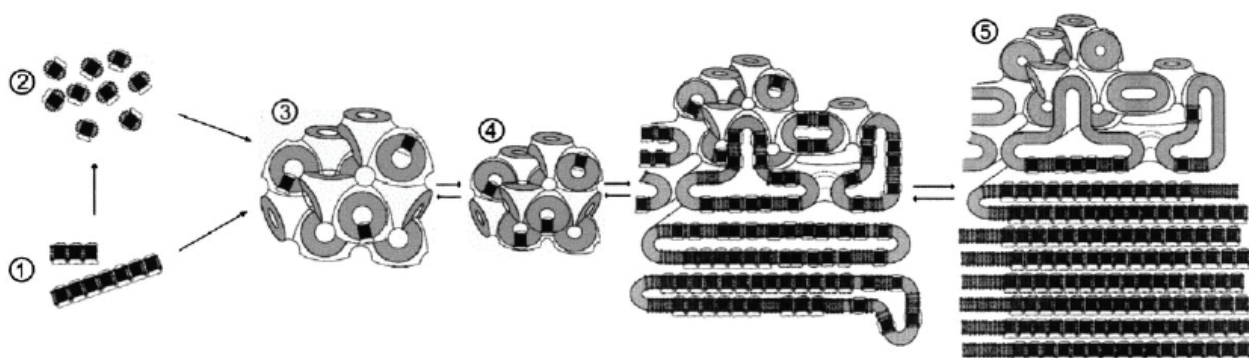
(<http://cherezov.scripps.edu/resources.htm>)

L'isotherme à 20°C croise plusieurs phases solides avec  $L_c$ , cristal lamellaire, liquide avec  $L_\alpha$  (cristal



liquide lamellaire), Pn3m-cubique (point A), Ia3d-cubique (point C) et un état d'équilibre entre une phase cubique hydratée et de l'eau (point B). FI : phase fluide isotropique.

La mésophase se forme en mélangeant la protéine purifiée en détergent avec une solution lipidique (monoléine en général). Des agents précipitants et des sels sont ajoutés. Des cristaux de type I peuvent ensuite apparaître. Cette technique se déroule généralement à 20°C mais le développement de nouveaux lipides permet aujourd'hui de travailler à basse température. Nollert et ses collaborateurs ont élucidé le mécanisme de cristallisation à partir des phases cubiques, comme illustré dans la figure 57 (Nollert et *al.*, 2001):



**Figure 57 : Le mécanisme de formation des cristaux de type I dans les phases cubiques lipidiques**  
(Nollert et *al.*, 2001).

- 1 et 2 : Mélange de la protéine purifiée avec la monoléine
- 3 : Protéines reconstituées dans les phases cubiques lipidiques
- 4 : Initiation de la cristallisation par l'ajout de précipitant
- 5 : Croissance de cristaux via la formation d'une phase lamellaire.

La protéine s'insère dans la phase cubique en formant des agencements 2D, ces derniers interagissent ensuite dans la troisième dimension. L'ajout de précipitant induit la déshydratation de la phase cubique et la formation d'une phase lamellaire, essentielle à l'obtention des cristaux. Plusieurs dizaines de structures cristallographiques dont celle de la bactériorhodopsine ont été résolues grâce aux phases cubiques lipidiques.

Une bicelle est une bicouche lipidique de taille finie qui s'obtient suite à l'addition de détergent tel que le CHAPSO avec des lipides à longues chaînes comme le dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC). Le mélange s'assemble sous forme d'un disque où les lipides forment une bicouche protégée de l'eau par les détergents qui se fixent sur le côté. Plusieurs protéines dont la bactériorhodopsine de *H. salinarum* ont pour l'heure été cristallisées grâce à la technique des bicelles (Faham et Bowie, 2002).

## IV. LE TRANSPORTEUR ABC BMRA DE *BACILLUS SUBTILIS*

### A. GENERALITES

*Bacillus subtilis* est une bactérie à Gram positive vivant dans le sol et les milieux marins. En 1997, le séquençage complet de son génome a été publié (Kunst et *al.*, 1997) et a ainsi révélé la présence de 38 importateurs et 40 exportateurs ABC (Quentin et *al.*, 1999). Dans le but d'identifier un nouveau transporteur ABC impliqué dans le phénotype MDR, une comparaison de séquences entre le gène du demi-transporteur ABC LmrA de *Lactococcus lactis* et ceux de *Bacillus subtilis* a été entreprise. Ceci a permis d'identifier le gène YvcC, codant pour un demi-transporteur de 589 acides aminés (65 kDa) et présentant 42 % d'identité stricte de séquence avec LmrA (Steinfels et *al.*, 2002). Il partage également 30 % d'identité et plus de 50 % de forte similarité de séquence avec les moitiés N- et C- terminales de la P-gp ainsi qu'avec le demi-transporteur MsbA. L'alignement des séquences d'YvcC, MsbA et LmrA permet de prédire une topologie identique avec un TMD constitué de six segments transmembranaires associé à un NBD possédant les séquences consensus caractéristiques (Walker A, Walker B et signature S).

Une étude réalisée sur la souche sauvage de *Bacillus subtilis* a montré qu'YvcC était responsable de l'efflux réserpine sensible (un inhibiteur de P-gp) de bromure d'éthidium (Steinfels et *al.*, 2004), un agent intercalant classiquement transporté par les protéines MDR (van Veen et *al.*, 1996). Une expérience de transport de substrats fluorescents réalisée sur des vésicules de membrane inversées montre qu'YvcC transporte des molécules comme le Hoechst 33342, la 7 amino-actinomycine D et la doxorubicine. Ce transport est ATP dépendant et inhibé par l'orthovanadate. Une étude d'atténuation de la fluorescence intrinsèque des tryptophanes d'YvcC montre que la protéine fixe une grande variété de substrats de structures non apparentées (tableau 11) dont ceux de la P-gp (des molécules chimiothérapeutiques comme la doxorubicine, la daunorubicine, et la rhodamine 6G) (tableau 11) et de LmrA (des antibiotiques comme la clindamycine et la spiromycine).

Substrat	K <sub>D</sub> (μM)
Bromure d'éthidium	10.6 ± 3
Doxorubicine	22.1 ± 4.5
Daunorubicine	12.2 ± 3.5
Rhodamine 6G	22.4 ± 5.1
Vinblastine	5 ± 1.1
Tétraphénylphosphonium	15.4 ± 2.7
Hoechst 33342	9.5 ± 2.3
LY 335979	4.4 ± 0.7
GF 120918X	0.44 ± 0.02

**Tableau 11. Quelques substrats de BmrA et leur affinité.**

Il lie également les inhibiteurs LY 335979 et GF 120918X, des produits testés cliniquement contre la P-gp (Steinfels et *al.*, 2004). Le rôle et les substrats physiologiques d'YvcC dans *Bacillus subtilis* restent pour l'heure inconnus. L'ensemble de ces résultats confirment qu'YvcC est un transporteur ABC de multiples médicaments, le premier de la famille ABC décrit chez *Bacillus subtilis*. Il fut rebaptisé BmrA pour *Bacillus* Multidrug Resistance ATP.

## B. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES ET STRUCTURALES

### Activité ATPasique et état d'oligomérisation

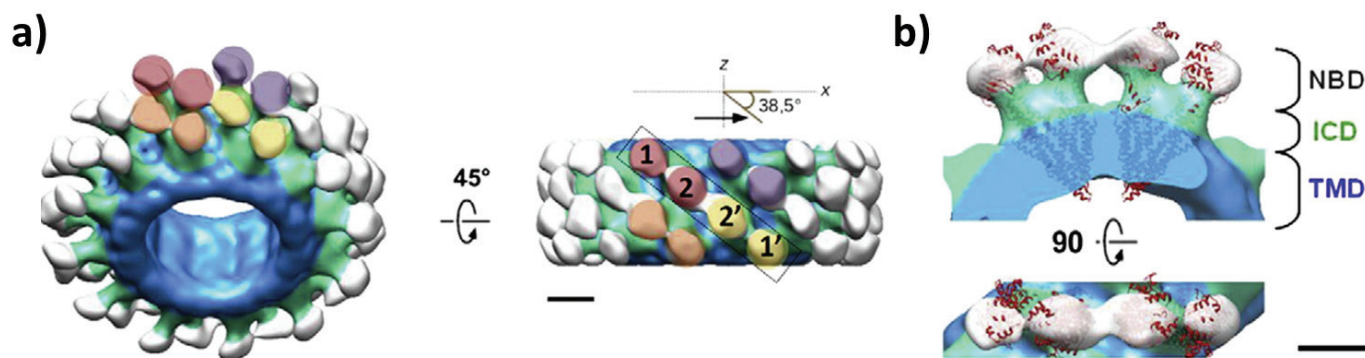
BmrA a été surexprimé de façon hétérologue dans la souche C41(DE3) d'*Escherichia coli* où il atteint jusqu'à 50 % des protéines membranaires totales (Steinfels et *al.*, 2002). Après reconstitution en protéoliposomes, BmrA présente une forte activité ATPasique basale (7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), l'une des plus élevées jamais décrites pour un transporteur ABC. Cette activité est relativement peu stimulée par la présence de substrats (environ 20 %). Ces deux caractéristiques constituent des propriétés intrinsèques de la protéine. A titre de comparaison, les activités ATPasiques de MsbA (Doerrler et Raetz, 2002) et LmrA (Vigano et *al.*, 2002) sont respectivement de 0,15 et 0,3  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Celle de P-gp (6,5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) est en revanche très proche de celle de BmrA (Ramachandra et *al.*, 1998).

BmrA purifiée en dodécylmaltoside possède une activité dix fois plus faible, de l'ordre de 0,7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Des expériences de vitesse de sédimentation et d'équilibre réalisées sur BmrA purifiée en détergent montrent que la protéine s'organise sous forme homodimérique (Ravaud et *al.*, 2006). L'étude de BmrA par chromatographie d'exclusion diffusion et ultracentrifugation analytique montre que la protéine purifiée en DDM forme un PDC d'environ  $300 \pm 30$  kDa avec 380 molécules de détergent et 12 de phospholipides (Ravaud et *al.*, 2006). Des expériences par transfert d'énergie de résonance (FRET) en utilisant la fluorescence en temps résolue ont été réalisées sur BmrA reconstitué en protéoliposomes et ont confirmé l'organisation dimérique du transporteur au sein de la membrane (Dalmas et *al.*, 2005).

### Modèles 3D de BmrA par cryo-microscopie électronique

Des études structurales ont été entreprises sur BmrA par cryo-microscopie électronique (Fribourg et *al.*, 2014). Après avoir retiré de manière contrôlée le détergent, BmrA a été reconstitué dans un environnement membranaire (mélange phosphatidylcholine et acide phosphatidique). Deux modèles tridimensionnels ont pu être obtenus en absence de nucléotides à des résolutions respectivement de 2,3 et 2,5 nm. Le transporteur s'associe en oligomère pour former deux types d'assemblages supra-moléculaires en double roulette d'environ 40 nm de diamètre et contenant 24 ou 39 homo-dimères de BmrA (figure 58a). Le positionnement de structures de transporteurs ABC entiers comme P-gp de souris et MsbA à l'intérieur de la densité électronique montre que BmrA adopte une conformation inward facing mais avec une ouverture variable des deux domaines nucléotidiques (figure 58b) : 3 nm dans l'une (ce qui est similaire à la P-gp de *mus musculus*) et 5 nm dans l'autre (ce qui est identique à la structure de MsbA d'*E. coli*). Ces deux structures de BmrA obtenues dans

un environnement non cristallin illustre la flexibilité structurale de ces transporteurs. Cela confirme une fois de plus que la conformation inward facing avec les NBDs séparés existe bien physiologiquement au sein de la membrane. Enfin, la cristallographie électronique de cristaux 2D obtenus en présence d'ATP-orthovanadate a permis d'obtenir le modèle tridimensionnel de BmrA dans une conformation outward facing avec les NBDs en contact et les TMDs séparés, à une résolution de 1,6 nm.



**Figure 58 : Modèle 3D de BmrA à 25 Å de résolution obtenu en absence de nucléotides par cryo-microscopie électronique (Fribourg et al., 2014).**

**a)** Structure oligomérique en roulette composée de 24 homodimères de BmrA répétés. Les lobes orientés vers l'extérieur représentent les NBDs. Deux homodimères sont indiqués par 1,2 et 1',2'. Les NBDs sont colorés en blanc, les TMDs en bleu et les domaines intracellulaires en vert.

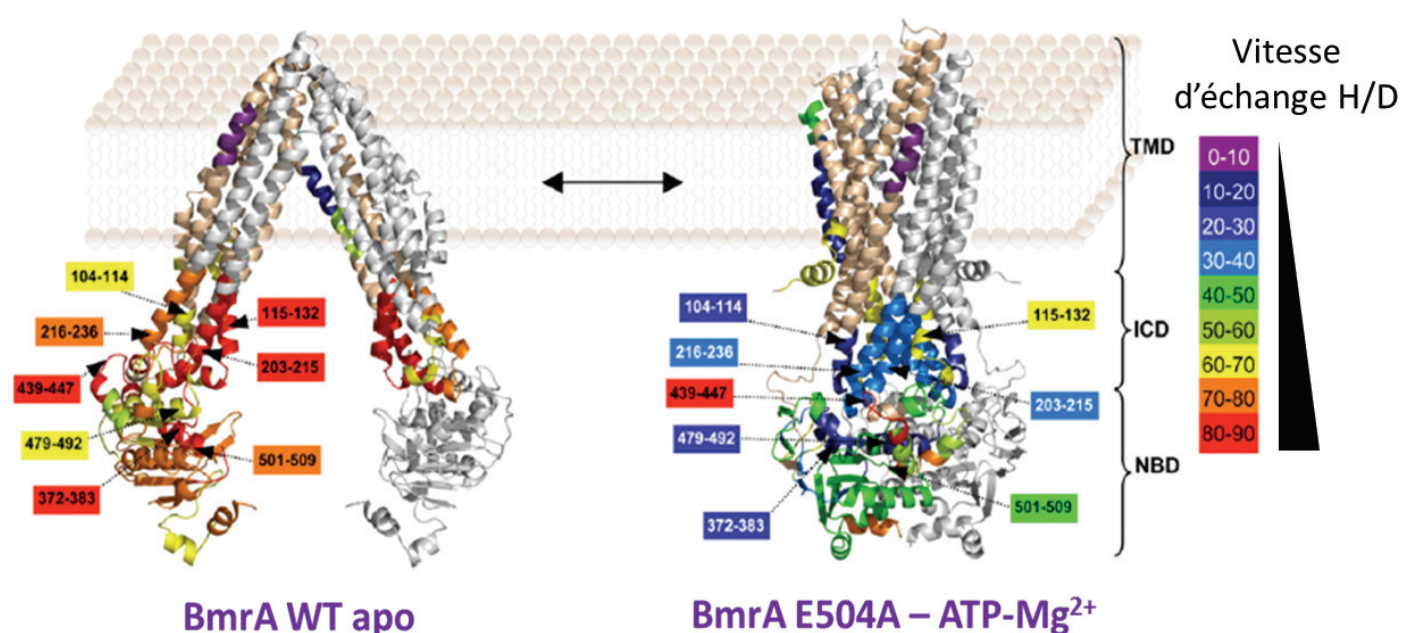
**b)** Le positionnement de la structure du transporteur ABC entier P-gp de *Mus musculus* dans l'homodimère de BmrA montre que le transporteur adopte une conformation inward facing avec les NBDs séparés.

La structure oligomérique en roulette de BmrA a également permis d'observer l'effet produit par l'addition de différents effecteurs de BmrA. Ainsi, l'ATP-Mg<sup>2+</sup> qui induit la dimérisation des NBDs provoque un changement conformationnel suffisant pour entraîner la cassure des roulettes. Ceci suggère que la fermeture des NBDs génère suffisamment d'énergie pour permettre le transport des substrats (Fribourg et al., 2014).

### Les Changements conformationnels

En 2012, des expériences d'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse réalisées sur BmrA en membrane et détergent (Mehmood et al., 2012) ont mis en évidence que le transporteur adopte deux conformations très différentes au cours du cycle de transport. Cette technique est basée sur la labilité des hydrogènes des liaisons peptidiques qui vont pouvoir s'échanger avec des atomes de deutérium après incubation de BmrA dans un tampon deutéré. L'incorporation et la localisation des deutériums au sein de la protéine peuvent être suivies en analysant la masse des différents peptides (d'environ 15 aminoacides) issus de la protéolyse de BmrA par la pepsine. La couverture de séquence des peptides identifiés par spectrométrie de masse avec cette enzyme est de 100 % au niveau des NBDs et de 60 % dans les TMDs (la majorité correspond aux peptides des domaines intracellulaires ICD1 et 2 qui relient les TMs 2-3 et 4-5). La comparaison des vitesses

d'échange pour chaque peptide de BmrA obtenu en absence et présence de nucléotides rend compte des variations de l'exposition au solvant et renseigne sur les changements conformationnels de la protéine (figure 59). Dans la forme ouverte en absence de nucléotides, les peptides 372-383 (Walker A), 479-492 (Signature S), 501-509 (Walker B) sont très sensibles aux échanges hydrogène/deutérium alors que dans la forme fermée stabilisée avec le mutant catalytique E504A qui fixe mais n'hydrolyse pas l'ATP, ces peptides résistent aux échanges H/D. Les peptides 104-114 et 203-215 qui correspondent aux domaines intracellulaires 1 et 2 présentent également une forte variation d'échange H/D entre les deux conformations. Ceci confirme qu'à l'état de repos BmrA est très flexible et peut adopter de multiples conformations alors que dans la conformation fermée, la structure est très rigide. Cette grande flexibilité à l'état de repos pourrait ainsi permettre au transporteur de s'adapter à la nature très variée des molécules transportées.



**Figure 59 : Echange H/D de peptides visualisés sur des modèles 3D de BmrA**  
(Mehmood et al., 2012).

Modèles 3D de BmrA en conformation ouverte (à gauche) et en conformation fermée (à droite). Une sous-unité est colorée en beige et l'autre en gris. Les peptides identifiés sont dessinés avec des couleurs arc-en-ciel (pour un monomère et pour tous les ICDs) selon leur pourcentage d'échange H/D après 3600 s. L'échelle d'échange est illustrée à droite de la figure.

Ces deux conformations très différentes de BmrA ont également été confirmées par des expériences de digestion trypsique. Dans la forme apo, BmrA est rapidement digéré par l'enzyme aussi bien en membrane qu'en DDM. Alors que dans la conformation fermée (stabilisée avec ATP-Mg<sup>2+</sup> plus orthovanadate), BmrA résiste à la protéase dans les deux cas (Mehmood et al., 2012).



## C. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE

Comme nous venons de le voir dans cette partie bibliographique, il est essentiel de déterminer les structures cristallographiques d'autres transporteurs ABC, en particulier en complexe avec des substrats/médicaments anti cancéreux, afin de mieux comprendre le mécanisme de leur transport à travers la membrane et de parvenir à contrecarrer le phénomène de résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques. Ceci constituerait un point de départ crucial pour la mise au point de nouveaux inhibiteurs spécifiques des transporteurs ABC.

C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude cristallographique de la protéine BmrA de *Bacillus subtilis*. Le chapitre qui va suivre présentera donc la méthodologie employée et les principaux résultats obtenus lors de cette étude structurale. Nous décrirons, dans un premier temps, l'influence des détergents sur la purification et la cristallisation du transporteur. Puis nous détaillerons tous les essais de cristallisation qui ont été réalisés avec le mutant inactif E504A purifié en DDM et LMNG. Nous terminerons cette partie par la description des expériences d'optimisation des conditions de cristallisation qui nous ont permis d'obtenir des cristaux de taille et de qualité de diffraction très prometteurs.

Une information-clé lorsqu'on extrait, purifie ou cristallise les protéines membranaires est de connaître la concentration réelle du détergent présent dans le milieu, largement dépendante de la protéine membranaire d'intérêt et influençant directement le niveau d'agrégation, la cristallogenèse, la stabilité du cristal et son degré de diffraction. Il n'existait jusqu'à aujourd'hui aucune méthode qui permette d'obtenir cette information en routine, rapidement, et avec un détergent quelconque.

Le chapitre 3 sera donc consacré à la description d'une nouvelle technique de dosage des détergents, que nous avons développé au laboratoire et qui est basée sur la spectrométrie de masse de type MALDI (matrix-assisted UV-laser desorption ionization mass spectrometry). Cette méthode permet de doser potentiellement tous les détergents, rapidement, avec un degré de précision très élevé. Nous décrirons dans un premier temps, la méthodologie et l'appareillage nécessaires à l'emploi de cette technique. Nous validerons ensuite la méthode avec les quatre principaux types de détergents : la foscholine 12 (FC12), le dodecylmaltoside (DDM), l'octylglucoside (OG) et les nouveaux détergents stabilisants comme le C4Cn ou le LMNG. Nous mesurerons ensuite la concentration libre et liée de ces détergents à différentes protéines membranaires, dans plusieurs conditions d'extraction/purification, de concentration, dialyse et gel filtration. Nous estimerons la forme et la taille de la ceinture de détergent autour de ces protéines membranaires. Enfin, nous verrons que cette technique nous a permis d'apprendre de nouvelles informations sur le comportement des complexes protéine-détergent en solution, qui devraient faciliter l'étude structurale et fonctionnelle des protéines membranaires en général.



**CHAPITRE 2 :**  
**ETUDE STRUCTURALE DU TRANSPORTEUR**  
**ABC BMRA DE *BACILLUS SUBTILIS***

## **I. INFLUENCE DES DETERGENTS SUR LA PURIFICATION ET LA CRISTALLISATION DE BMR.**

Comme nous l'avons vu précédemment, résoudre la structure d'une protéine membranaire par cristallographie aux rayons X représente un véritable challenge, compte tenu du nombre de difficultés propres à leur étude. Parmi elles, les détergents jouent un rôle crucial et déterminant puisqu'ils sont impliqués dès l'étape de solubilisation jusqu'à la cristallisation. La première partie de l'étude réalisée sur le transporteur BmrA a donc consisté à sélectionner le détergent qui permette d'obtenir un bon rendement d'extraction, un très haut degré d'homogénéité et qui favorise la formation de cristaux tridimensionnels. Nous avons ainsi montré par chromatographie d'exclusion diffusion, gels dénaturants et chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem l'influence de plusieurs détergents sur la purification de BmrA. Nous verrons à travers les essais de cristallisation qui ont été entrepris que cette étape n'est absolument pas triviale et qu'il est nécessaire d'y consacrer du temps pour faire le bon choix.

Nous présenterons tout d'abord dans ce chapitre le matériel et les méthodes qui ont été utilisés pour purifier et cristalliser BmrA. Puis, nous reviendrons dans un second temps sur les résultats obtenus, les difficultés rencontrées et discuterons de leur intérêt pour la suite de nos recherches.

### **A. MATERIEL & METHODES**

#### **Préparation des membranes enrichies en BmrA**

##### **a) Le matériel biologique**

###### **(1) La souche bactérienne**

BmrA est surexprimé dans la souche bactérienne C41(DE3) qui est un mutant d'*Escherichia coli* dérivé de BL21(DE3). Son génome a intégré l'ADN du phage  $\lambda$ DE3 et comporte le gène codant pour l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur lacUV5 inducible par l'isopropyl thiogalactoside (IPTG, analogue du lactose). Cette souche présente des mutations dans le promoteur lacUV5, ce qui permet d'améliorer l'expression des protéines membranaires et d'être moins sensible à l'effet toxique de leur surexpression au niveau des membranes (Wagner et *al.*, 2008).

Les bactéries sont cultivées dans un milieu LB (Luria-Bertani, 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g de NaCl, qsp 1 L) et 2YT (16 g de tryptone, 10 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl, qsp 1 L).

###### **(2) Le plasmide d'expression**

Le plasmide pet15b(+) contient le promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 en amont du gène inséré. Cette ARN polymérase est produite par la bactérie hôte de génotype (DE3) après induction par l'IPTG. Le plasmide est maintenu dans la bactérie en présence

d'ampicilline dans le milieu de culture. Il permet de greffer une étiquette hexahistidine en N-terminal de la protéine d'intérêt.

## **b) Minipréparation des plasmides**

Les plasmides ont été amplifiés dans la souche XL1-blue d'*Escherichia coli* déficiente en enzymes de recombinaison et restriction. Les bactéries, préalablement transformées avec le plasmide pet15b(+)-BmrA, sont cultivées pendant une nuit à 37°C, à 180 rpm, dans 5 ml de LB additionné de 50 µg/ml d'ampicilline. Le lendemain, la culture est centrifugée à 10 000xg pendant 5 minutes. La lyse bactérienne et la purification des plasmides sont réalisées grâce au kit « QIAprep Spin Miniprep » (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant. Les bactéries sont lysées dans un tampon alcalin en présence de SDS (qui solubilise les phospholipides et les protéines membranaires libérant ainsi le contenu de la bactérie) et de RNase. L'ADN chromosomique est précipité dans une solution saline et éliminé par centrifugation. L'ADN plasmidique est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en présence d'une forte concentration en sels avant d'être élué par un tampon faiblement concentré en sels. Les protéines, les métabolites cellulaires et l'ARN ne sont quant à eux pas retenus sur la colonne. La concentration des plasmides purifiés a été déterminée spectrophotométriquement au nanodrop à 260 nm (typiquement 200 ng/µl). Les plasmides sont dilués dix fois dans de l'eau stérile puis conservés à -20°C.

## **c) Préparation et transformation des bactéries compétentes C41(DE3)**

Les bactéries C41(DE3) sont rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium. Le protocole est le suivant : une colonie estensemencée dans 4 ml de milieu LB, puis incubée à 37°C toute la nuit à 190 rpm. Le lendemain, la DO<sub>600 nm</sub> est d'environ 4 ; 2,5 ml de cette culture est ajouté à 100 ml de milieu LB (DO initiale : 0,1). La culture est effectuée à 37°C sous agitation (180 rpm) jusqu'à une DO de 0,4. La culture est alors refroidie 15 minutes dans la glace puis centrifugée à 2000xg, 4°C pendant 10 minutes. Le culot bactérien est repris dans une solution de 10 ml de CaCl<sub>2</sub> stérile et froide (60 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % glycérol, 10 mM PIPES pH 7,0) et la suspension est centrifugée 5 minutes à 1600xg à 4°C. Le culot est suspendu de la même manière et incubé 30 minutes dans la glace. Après centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est repris dans 4 ml de CaCl<sub>2</sub> stéril et froid et la suspension bactérienne est aliquotée par fractions de 200 µl, qui sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Les bactéries sont ensuite transformées par le plasmide pet15b(+) dans lequel est cloné le gène *BmrA* (disponible au laboratoire). Cent microlitres de bactéries compétentes C41(DE3) sont décongelées dans la glace avant d'ajouter 4 µl de plasmide purifié (à 20 ng/µl). Après une incubation de 20 minutes dans la glace, un choc thermique est réalisé pendant 45 secondes à 42°C. Ce stress fragilise les membranes et facilite l'entrée de l'ADN plasmidique dans les cellules compétentes. Les bactéries sont ensuite mises en culture par l'ajout de 300 µl de milieu riche (SOC) afin de régénérer la membrane bactérienne. L'ensemble est placé 1 h à 37°C sous agitation (190 rpm). Des volumes variables (20 et 50 µl) de cette solution sont étalés sur boîte de LB-agar contenant de l'ampicilline (50 µg/ml), né-

cessaire à la sélection des bactéries recombinantes. Après une nuit à 37°C, les boîtes contenant les colonies sont transférées à 4°C.

#### d) **Sur-production de BmrA**

Une colonie isolée est utilisée pour ensemer 200 ml de milieu de culture 2YT (erlen de 1 litre), auquel on ajoute de l'ampicilline à une concentration finale de 50 ng/μl. La pré-culture est incubée toute la nuit à 37°C sous agitation (190 rpm). En parallèle, quatre litres de milieu 2YT sont autoclavés (1 l par erlen de 5 l). A partir d'une absorbance à 600 nm de 3,5 dans la pré-culture, de l'ampicilline fraîche (50 ng/μl) est ajoutée dans les quatre litres de milieu et celui-ci estensemencé avec 28 ml de pré-culture (DO initiale : 0,1). La culture bactérienne est ensuite incubée à 25°C à 180 rpm. La croissance bactérienne est suivie par mesure d'absorbance à 600 nm en spectrophotométrie. L'expression protéique est déclenchée à une DO d'environ 0,9-1 par l'ajout d'IPTG à 0,7 mM final suivi d'une incubation à 25°C pendant trois heures dans les mêmes conditions. La DO finale est aux alentours de 3.

#### e) **Lyse cellulaire et récupération des membranes enrichies en BmrA**

Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 7500xg pendant 15 minutes à 4°C. Les culots (correspondant chacun à 1 l de culture) sont pesés (rendements moyens de 4 g de cellules) et sont repris par 10 ml de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). On ajoute également des inhibiteurs de protéase (une pastille pour 50 ml). La lyse bactérienne est réalisée à l'aide du microfluidiseur avec lequel trois passages successifs sont effectués à une pression de 18000 psi. Cet appareil consiste à projeter les cellules en suspension en deux jets séparés, l'un face à l'autre, ce qui entraîne l'éclatement des cellules sous la force de l'impact. Dix millimolaires final d'EDTA pH 8 sont ajoutés pour éviter la dégradation des protéines par des métalloprotéases en chélatant les traces de métal qui pourraient catalyser l'oxydation des protéines. Une centrifugation à 15000xg pendant 30 minutes à 4°C permet d'éliminer les débris cellulaires et les protéines insolubles. Du PMSF est ajouté dans le surnageant à une concentration finale de 1 mM. Le surnageant est ensuite centrifugé à 180000xg pendant une heure à 4°C. Chaque culot est resuspendu dans 25 ml de tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM PMSF et une pastille d'anti-protéases pour 50 ml). La suspension est centrifugée à 180000xg pendant 1 h à 4°C afin de récupérer les membranes bactériennes enrichies en BmrA dans le culot. Celui-ci est repris par 2 ml de tampon de stockage (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM sucrose et 1 mM EDTA), aliquoté et stocké dans l'azote liquide. Un aliquot de 50 μl est conservé pour déposer sur gel SDS-PAGE et pour déterminer la concentration protéique par dosage à l'acide bicinchoninique (Smith et *al.*, 1985).

#### f) **Dosage des protéines membranaires par l'acide bicinchoninique**

Cette méthode est une variante de la méthode du Biuret par laquelle les protéines réduisent les ions cuivriques Cu<sup>2+</sup> en ions cuivreux Cu<sup>+</sup>, en milieu alcalin. L'addition d'acide bicinchoninique permet d'augmenter l'intensité de la réaction colorée, deux molécules d'acide bicinchoninique se chélatant par ion Cu<sup>+</sup>. Le complexe formé est de couleur pourpre.

L'absorbance lue à 562 nm est directement proportionnelle à la concentration en liaison peptidique.

Dans une plaque 96 puits, 10 µl d'échantillon dilué au dixième sont ajoutés au mélange contenant 1 µl d'eau et 3 µl de SDS 10 %. 226 µl du réactif (ratio : 5 ml de BCA pour 100 µl de sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$ ) sont ajoutés. En parallèle, on réalise une gamme d'étalonnage de 0 à 80 µg de protéines à partir d'une solution standard d'albumine de sérum bovin (BSA) à 10 mg/ml. Les échantillons sont incubés à 37°C sous agitation pendant 30 minutes puis l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 562 nm. La courbe étalon  $\text{Abs} = f(C_{\text{protéique}})$  permet d'en déduire la concentration protéique.

## Purification de la protéine BmrA en FC12

### a) Extraction de BmrA

BmrA a été solubilisé en foscholine 12 (FC12). Ce détergent se montre très efficace pour extraire la protéine (Wiseman *et al.*, 2014; Matar *et al.*, 2011) et a été utilisé avec succès pour résoudre les structures cristallographiques de plusieurs protéines membranaires (Kefala *et al.*, 2010).

Les membranes sont rapidement décongelées dans un bécher d'eau froide. Le tampon de solubilisation (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM DTT, 0,02 mM EDTA et inhibiteurs de protéases) est ensuite ajouté de manière à diluer les membranes à 2 mg/ml en présence de 1% de FC12. Les protéines sont solubilisées pendant deux heures à 4°C sur roue. Le matériel insoluble est éliminé par ultracentrifugation à 100000xg pendant une heure à 4°C. Le surnageant et le culot sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

### b) Purification des protéines par chromatographie échangeuse d'anions

La charge nette des protéines d'une solution varie en fonction du pH du tampon (la protéine est chargée négativement si le pH du tampon est supérieur à son point isoélectrique et positivement si le pH est inférieur au  $\text{pHi}$ ). Dans une colonne échangeuse d'anions de type Q-sépharose, les protéines dont la charge nette est négative se lient aux groupements triméthyl ammonium chargés positivement de la résine. C'est le cas de BmrA dont le point isoélectrique calculé 6,55 et qui à pH 8,0 est chargé négativement. Les protéines fixées à la résine sont séparées en appliquant un gradient de NaCl. Des contre ions ( $\text{Cl}^-$ ) entrent en compétition avec les groupements chargés de la protéine pour les sites de la résine.

Une colonne de gel Q-sépharose Fast Flow de 5 ml (GE Healthcare) est équilibrée avec deux volumes de tampon B (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 0,5% de FC12 et anti-protéases) et cinq volumes de tampon A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% FC12 et antiprotéases). Le surnageant contenant les protéines membranaires solubilisées est dilué deux fois dans le tampon A afin de diminuer la concentration de NaCl à 50 mM. La solution de protéines est ensuite injectée sur la colonne à un débit de 2 ml/min. Une fois les protéines anioniques fixées, la colonne est lavée avec dix volumes de tampon A. Les protéines sont éluées en appliquant un gradient de 0 à 1 M de NaCl à 3 ml/min avec les tampons A et B sur

dix volumes de résine et collectées par fractions d'un ml. La présence de protéines dans les différentes fractions est contrôlée sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE.

### c) Purification par chromatographie d'affinité sur gel de nickel agarose.

La chromatographie d'affinité utilisant un métal ( $\text{Ni}^{2+}$ ) immobilisé sur une résine d'agarose (dite IMAC pour immobilized metal affinity chromatography) repose sur la capacité de chélation du nickel par l'histidine. Une séquence de six résidus histidine, appelée étiquette est fusionnée à l'extrémité N-terminale de BmrA pour lier le nickel. L'ion  $\text{Ni}^{2+}$  est fixé sur la résine sépharose par l'acide nitrilotriacétique (NTA) à l'aide de quatre liaisons de coordination, deux autres liaisons permettent l'interaction entre l'ion  $\text{Ni}^{2+}$  avec les atomes d'azote du cycle de la chaîne latérale de deux résidus histidine. Après fixation des protéines sur le support, on utilise 20 mM d'imidazole qui entre en compétition avec les résidus histidine pour éliminer les protéines fixées non spécifiquement puis 500 mM pour élué BmrA.

Une colonne  $\text{Ni}^{2+}$  HiTrap Chelating de 5 ml (GE Healthcare) est équilibrée avec cinq volumes de tampon A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0,3% FC12 et des antiprotéases). Les protéines sont ensuite chargées à 2 ml/min et la résine est lavée avec dix volumes de tampon A. L'élution est faite par un gradient linéaire de 10 à 500 mM d'imidazole sur six volumes de colonne avec le tampon B (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 500 mM imidazole, 0,3% FC12 et antiprotéases) et la protéine est collectée par fractions d'un ml.

### d) Dialyse et concentration des protéines

La solution purifiée de  $(\text{His})_6$ -BmrA après chromatographie d'affinité sur gel de nickel agarose est très concentrée en imidazole (200 à 250 mM) et en sels (200 mM de NaCl). En outre, si elle est concentrée après cette étape, le détergent s'accumule dans le concentrat jusqu'à 10% de FC12 du fait de la porosité limite des cellules d'ultrafiltration (50 kDa). L'imidazole et les micelles de FC12 libres interfèrent dans le dosage des protéines du fait de leur absorbance à 280 nm mais aussi dans les propriétés de cristallisation de la protéine. L'échantillon est donc dialysé pour limiter la concentration en sel, éliminer l'imidazole ainsi que l'excès de détergent. La CMC relativement élevée de la FC12 (1-1,5 mM) facilite son élimination par cette technique.

La solution de protéines est placée dans un boudin de dialyse avec un seuil de coupure de 50 kDa. La dialyse s'effectue pendant la nuit à 4°C sous agitation douce contre 1 L de tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl et 0,15 % de FC12. La protéine purifiée est concentrée jusqu'à 20 mg/ml par centrifugation à 4000xg à travers une membrane d'ultrafiltration en cellulose possédant une limite d'exclusion de 50 kDa (Amicon Ultra de 15 ml, Millipore).

### e) Dosage des protéines à 280 nm

La concentration de la protéine purifiée est déterminée par spectrophotométrie U.V en mesurant son absorbance à 280 nm. L'application de la loi de Beer-Lambert ( $DO = \epsilon \cdot l \cdot C$ ) permet de calculer la concentration à partir du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{280}$  de la



solution. Le coefficient d'extinction théorique (calculé sur la base de la composition en acides aminés aromatiques de la protéine) du monomère de BmrA à 280 nm est de 36 300 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Les mesures sont effectuées sur un spectrophotomètre UV-visible nanodrop. Cet appareil présente l'avantage de n'utiliser que de faibles volumes d'échantillons (2 µl) qui sont directement déposés sur le système optique.

### **Purification de BmrA avec six détergents différents (DDM, UDM, LMNG, DMNG, LDAO et FC12)**

#### **a) Chromatographie d'affinité Ni-NTA**

Dans ce cas, les protéines sont extraites avec 1 % de détergent. L'étape de chromatographie échangeuse d'anions est éliminée. Les tampons sont modifiés comme suivant :

- ⊕ Tampon de solubilisation: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 % glycérol, 10 mM imidazole, 1 mM PMSF et anti-protéases
- ⊕ Tampon A-Ni : 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10 % glycérol, 1 mM PMSF, anti-protéases + 0,05% DDM/0,2% UDM/0,05% UTM/0,02% LMNG/0,2% LDAO/0,3% FC12
- ⊕ Tampon B-Ni : 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 250 mM imidazole, 10% glycérol, 1 mM PMSF, anti-protéases + 0,05% DDM/0,2% UDM/0,05% UTM/0,02% LMNG/0,2% LDAO/0,3% FC12

#### **b) Chromatographie d'exclusion diffusion**

Nous avons utilisé ce type de chromatographie dans le but d'analyser la monodispersité et l'état d'agrégation de BmrA purifié dans chaque détergent. Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur rayon hydrodynamique. Les colonnes de chromatographie d'exclusion diffusion contiennent des granules de gel poreux dont la taille des pores est choisie en fonction du diamètre des protéines à séparer. Les grosses protéines, dont le diamètre est supérieur à celui des pores, sont exclues des billes de gel et sont éluées les premières. Les protéines de taille inférieure au diamètre des billes diffusent dans le gel et sont éluées plus tardivement car leur migration est ralentie. Les molécules sont éluées dans l'ordre inverse de leur rayon hydrodynamique et donc en général de leur masse moléculaire. Ce type de chromatographie permet de mettre en évidence les différentes formes moléculaires d'une protéine. Elle est classiquement utilisée à la fin des étapes de purification pour éliminer les contaminants résiduels tels que l'imidazole ou les protéines de petite taille.

#### **c) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes**

L'homogénéité des solutions protéiques est contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE pour Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) selon la méthode de Laemmli (1970).

Le sodium dodécyl sulfate est un détergent anionique. Sa chaîne carbonée lui permet de se lier très fortement aux domaines hydrophobes des protéines. Chaque molécule de SDS apporte deux charges négatives, formant un polyanion autour de la chaîne polypeptidique.

Les charges se repoussent entraînant la dénaturation des protéines qui perdent leur structure tridimensionnelle native. La quantité de SDS fixée étant proportionnelle à la taille des chaînes polypeptidiques, les protéines ont toutes le même rapport charge sur masse. La séparation se fait uniquement selon leur poids moléculaire. Le polyacrylamide résulte de la polymérisation d'acrylamide et de bis acrylamide qui assure le pontage entre les chaînes. Ce gel agit comme tamis moléculaire, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus les pores du gel sont étroits. Une protéine de bas poids moléculaire migre plus loin qu'une protéine de poids moléculaire plus élevée. Le gel de polyacrylamide est constitué de deux gels de réticulation différente. La faible réticulation du gel de concentration (5% d'acrylamide) permet aux protéines de pénétrer facilement et de se concentrer à l'interface avec le gel de séparation. Ce dernier présente une réticulation plus élevée (10% d'acrylamide) afin de séparer les protéines par électrophorèse SDS-PAGE. La réaction de polymérisation est initiée par le persulfate d'ammonium et catalysée par le *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED).

Le gel de concentration est composé de 5% d'acrylamide, 0,13% bis-acrylamide, 12,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium, 0,1% TEMED. Le gel de séparation contient 10% acrylamide, 0,27% bis-acrylamide, 37,5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium et 0,04% TEMED. Les échantillons protéiques sont dissous dans le tampon de Laemmli 5x (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0,01% bleu de bromophénol). La migration est réalisée à ampérage constant de 120 mA pendant 1h45. Le tampon de migration est constitué de 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM glycine et 0,1% SDS. Les protéines sont colorées pendant 30 minutes dans une solution de bleu de coomassie (10% acide acétique, 25% isopropanol, 1% méthanol et 0,025% bleu de coomassie R250) puis décolorées 1h dans 10% d'acide acétique.

#### **d) Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)**

A partir d'une bande provenant d'un gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie, une digestion trypsique est effectuée. Les peptides obtenus sont ensuite injectés dans un système HPLC capillaire couplé à un spectromètre de masse avec source nanospray. Après ionisation, le spectromètre mesure la masse  $m/z$  de chaque peptide (MS) et le fragmente majoritairement au niveau de la liaison peptidique. Le spectre MS/MS est alors une représentation de la séquence du peptide. La protéine est ensuite identifiée en comparant la fragmentation théorique des séquences de protéines connues présentes dans les banques de données avec celle obtenue expérimentalement.

### **Cristallogénèse et cristallographie de BmrA en FC12**

#### **a) La technique de la goutte suspendue en phase vapeur**

Les essais de cristallisation ont tous été réalisés manuellement à 20°C dans des plaques Linbro de 24 puits (*Hampton Research*) selon le principe de diffusion de vapeur par la technique de la goutte suspendue. La diffusion de vapeur a lieu entre une goutte contenant la protéine et une solution contenant les agents de cristallisation dans une enceinte

hermétiquement fermée. On dépose sur une lamelle une goutte de 4  $\mu\text{l}$  composée de 2  $\mu\text{l}$  d'une solution contenant la protéine BmrA, le tampon (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,15% FC12), l'ADP (5 mM) et 2  $\mu\text{l}$  de la solution réservoir. Cette lamelle est retournée au dessus du puits qui contient 500  $\mu\text{l}$  d'une solution composée de l'agent précipitant, du tampon (0,1 M Tris-HCl pH 8,0) et du solvant organique.

Du fait de la différence de pression partielle entre les deux solutions, un transfert de vapeur d'eau s'effectue de la goutte vers le puits. La diminution du volume de la goutte entraîne l'augmentation de la concentration de la protéine et de l'agent précipitant. Si la sur-saturation est suffisante, la solution atteint la zone de nucléation du diagramme de phase où des germes cristallins peuvent se former. La concentration en protéine va ensuite diminuer jusqu'à atteindre la limite de solubilité et donner naissance à des cristaux de 50 à 500  $\mu\text{m}$ . Les plaques sont stockées à 20°C et les cristaux sont observés régulièrement à l'aide d'une loupe binoculaire. Les concentrations indiquées sont celles des solutions avant la formation des gouttes.

### **b) Optimisation des conditions de cristallisation**

Un premier criblage des conditions de nucléation a été réalisé à l'aide des kits commerciaux PEGs Suite 1 et 2 (Qiagen). La condition de départ : BmrA 10 mg/ml, 5 mM ADP, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 18% PEG 4000 a été optimisée en testant dans des boîtes 24 puits chaque paramètre physico-chimique indépendamment :

- ⊕ La température (4°C, 15°C, 20°C et 37°C)
- ⊕ La concentration de BmrA (4, 6, 8 et 10 mg/ml)
- ⊕ La nature et la concentration du polyéthylène glycol (200, 400, 1000, 2000 et 4000 Da).

A l'issue de chaque essai, nous avons retenu les conditions intéressantes et les avons affinées. De proche en proche, nous sommes parvenus à définir une condition optimale et reproductible de cristallisation.

### **c) Collecte des données de diffraction**

Une fois les cristaux obtenus, ils ont été prélevés à l'aide de microboucles magnétiques de taille adaptée (Hampton Research). Les cristaux ont été congelés à 100K dans l'azote liquide. La concentration élevée de PEG a permis d'éviter d'ajouter un cryoprotectant. Les données de diffraction ont été collectées sur les lignes de lumière ID23-1 de l'ESRF (Grenoble), Proxima 1 de Soleil (Paris) et Xaloc à Alba (Barcelone). Deux images séparées de 90° du cristal ont été enregistrées. Elles ont ensuite été traitées avec le logiciel Mosflm qui propose une stratégie d'acquisition que nous avons suivi. Une rotation de 200° avec un pas d'oscillation de 0,2° (1000 images) a en général suffi pour collecter un jeu complet.

## B. RESULTATS

### Etude des contaminants présents dans la purification de BmrA et les solutions pour les éliminer

**Publication 1:** “Stubborn contaminants: Influence of detergents on the purity of the multi-drug ABC transporter BmrA”, par Wiseman, Kilburg et *al.*, publié dans PLoS One en 2014.

#### a) Résumé des principaux résultats

Le gène *BmrA* a été cloné dans le plasmide pET15b, de façon à pouvoir exprimer la protéine avec une étiquette hexahistidine fusionnée à l'extrémité N-terminale (His<sub>6</sub>BmrA). Cette construction n'altère pas l'adressage à la membrane et la fonctionnalité de la protéine a été vérifiée par le transport du Hoechst 33342 et de la doxorubicine visualisé par spectrophotométrie (Matar et *al.*, 2010).

His<sub>6</sub>BmrA a été produite dans la souche C41(DE3) en milieu 2YT par induction à l'IPTG à 25°C dans des erlens de 5 L, comme décrit dans matériel et méthodes. La migration de cette fraction sur gel SDS-PAGE révèle la présence d'une bande à 55 kDa plus intense que les autres correspondant à BmrA. Celle-ci migre plus loin que la masse attendue (65 kDa), un phénomène observé dès la découverte de la protéine (Steinfels et *al.*, 2002). La fraction membranaire a été obtenue par éclatement des bactéries et centrifugations différentielles et permet d'obtenir à partir de quatre litres de culture une concentration en protéines totales d'environ 40 mg/ml. Le niveau d'expression de BmrA est très élevé, de l'ordre de 50% des protéines totales exprimées.

#### (1) La foscholine 12, détergent le plus efficace pour solubiliser BmrA

Afin d'optimiser la purification de His<sub>6</sub>BmrA, la capacité de différents détergents à solubiliser le transporteur a été testée. Parmi les détergents étudiés, la foscholine 12 et 16 (constitués d'un groupement phosphocholine estérifié avec une chaîne alkyle) sont les plus efficaces avec 90% de BmrA qui est extrait. Un autre détergent zwitterionique, le LDAO atteint en revanche un niveau de solubilisation relativement bas ( $\approx 25\%$ ). Les détergents maltosides comme le DDM, l'UDM, le LMNG et le DMNG extraient un peu moins de la moitié du BmrA produit. Le C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> et le  $\beta$ -OG solubilisent la plupart des protéines produites par *E. coli* mais pas BmrA. Ces résultats rejoignent les conclusions d'une étude portant sur 122 protéines membranaires de levure, où la foscholine 12 a été le seul détergent à réussir la solubilisation de toutes les protéines étudiées (White et *al.*, 2007). Ce détergent s'est aussi avéré le plus efficace pour solubiliser des protéines membranaires eucaryotes exprimées dans *S. cerevisiae* (Newstead et *al.*, 2007). La foscholine 12 a été utilisée avec succès pour solubiliser plusieurs transporteurs ABC comme LmrA, ABCG2, ABCB4 et ABCB11. Il a également été employé pour l'étude structurale par RMN de plusieurs protéines membranaires comme la diacylglycérol kinase, l'hémagglutinine et PagP, une enzyme de la membrane externe d'*E. coli*.

## (2) La purification et la cristallisation de BmrA en FC12 conduisent à la cristallisation de la porine OmpF de la membrane externe d'*E. coli*,

BmrA est extrait des membranes par solubilisation avec 1% (w/v) de FC12. Le surnageant obtenu est soumis à une chromatographie échangeuse d'anions suivie d'une colonne d'affinité au nickel selon le protocole décrit dans la partie matériel et méthodes. BmrA est élué en un pic homogène, fin et symétrique mais contient une fraction SDS-résistante aux alentours de 130 kDa. Le protocole de purification a permis d'obtenir un degré de pureté d'environ 90% et d'isoler 8 mg de protéines par litre de culture.

Un premier criblage des conditions de nucléation, réalisé à l'aide des kits commerciaux PEGs suite I et II, a permis d'obtenir les premiers cristaux qui diffractaient à basse résolution (15 Å). Leur optimisation a rapidement abouti à d'imposants cristaux 500 x 50 x 30 µm dans la condition de cristallisation : [BmrA] = 10 mg/ml, 5 mM ADP, 0,1 M Tris-HCl pH 8, 18% PEG 1500 et 10% MPD à 20°C. L'un d'eux a permis de collecter des données complètes de diffraction jusqu'à 3,8 Å de résolution sur la ligne de lumière ID23-1 de l'ESRF.

Les tentatives de remplacement moléculaire avec les différentes structures d'exportateurs ABC déjà résolues ne donnaient aucune solution malgré la richesse des conformations existantes. Le dépôt des cristaux sur gel SDS-PAGE montre clairement une différence de migration entre le monomère de BmrA à 55 kDa et celle des cristaux aux alentours de 70 kDa. L'analyse de cette bande par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) indique qu'il s'agit d'une porine de la membrane externe d'*E. coli*, OmpF. Les phases ont été obtenues par remplacement moléculaire avec Phaser en utilisant un trimère d'OmpF (PDB : 2ZFG) comme modèle. La protéine cristallise dans le groupe d'espace monoclinique C2 (qui n'a jamais été observé précédemment dans les autres structures d'OmpF) avec deux trimères dans l'unité asymétrique. La structure a été résolue à 3,8 Å de résolution et le modèle présente après affinement un  $R_{\text{work}}$  de 26,2 et un  $R_{\text{free}}$  de 31,4. Il a été déposé dans la Protein Data Bank sous le code 4JFB.

Le monomère d'OmpF (37 kDa) est constitué de 16 feuillets  $\beta$  formant un tonneau  $\beta$ . La protéine s'organise sous forme homotrimétrique pour être fonctionnelle et joue un rôle central dans la régulation de l'osmolarité chez *E. coli*. Chaque monomère forme un canal étroit qui exclue les molécules supérieures à 600 Da et permet la diffusion passive de petites molécules comme les nutriments à travers la membrane externe des bactéries Gram négatives.

## (3) OmpF et AcrB, des contaminants cachés et nuisibles à la cristallisation des protéines membranaires

La capacité naturelle de la FC12 à co-extraire et co-purifier OmpF avec BmrA a totalement remis en question le choix de ce détergent. Plusieurs détergents ont été sélectionnés (DDM, UDM, LMNG, UTM, LDAO et FC12) pour purifier BmrA sur colonne d'affinité au nickel puis par chromatographie d'exclusion diffusion pour analyser la monodispersité et l'état d'aggrégation de la protéine. En présence de détergents maltosides, BmrA est éluee en une population de protéines beaucoup plus homogène par rapport aux détergents zwi-



terrioniques. Les six fractions purifiées ont été déposées sur gel SDS-PAGE et chaque bande contaminante a été analysée par LC-MS/MS. OmpF est présent uniquement dans les échantillons purifiés en foscholine 12. Cette protéine possède un profil de migration sur gel SDS-PAGE identique à celui de BmrA rendant son identification difficile. Une autre protéine contaminante, AcrB (Acriflavine resistance protein B) a été détectée dans les échantillons purifiés en DDM et LMNG mais est absente des purifications en FC12 et LDAO. OmpF et AcrB sont deux contaminants fréquemment rencontrés dans la purification des protéines membranaires et ont été cristallisés accidentellement à de nombreuses reprises (Kefala et *al.*, 2010; Psakis et *al.*, 2009; Veessler et *al.*, 2008). Mais peu de solutions ont jusqu'à maintenant été proposées pour les éliminer.

#### (4) Les solutions pour éliminer OmpF et AcrB

Nous proposons différentes stratégies pour éliminer AcrB et OmpF des échantillons purifiés respectivement en DDM et FC12 :

Protéine	Stratégie d'élimination
<b>AcrB</b>	<p>Utiliser une souche d'<i>E. coli</i> délétée dans son génome du gène codant pour AcrB comme BL21 ou C43 <math>\Delta</math><i>acrB</i>.</p> <p>Incorporer 50 mM d'imidazole dans les tampons de charge et de lavage.</p> <p>Echanger le DDM par la FC12 sur une colonne d'affinité au nickel.</p> <p>Introduire un site de clivage par la thrombine après l'étiquette hexahistidine de BmrA.</p>
<b>OmpF</b>	<p>Utiliser une souche d'<i>E. coli</i> délétée dans son génome du gène codant pour OmpF.</p> <p>Utiliser une concentration en FC12 inférieure à 0,5% lors de l'étape d'extraction permet de s'affranchir de la bande à 120 kDa correspondant à OmpF.</p>

**Tableau 12. Les stratégies envisagées pour éliminer les contaminants OmpF et AcrB.**

## PUBLICATION 1

# STUBBORN CONTAMINANTS: INFLUENCE OF DETERGENTS ON THE PURITY OF THE MULTIDRUG ABC TRANSPORTER BMRA

Benjamin Wiseman\*, **Arnaud Kilburg\***, Vincent Chaptal, Gina Catalina Reyes-Mejia, Jonathan Sarwan, Pierre Falson, Jean-Michel Jault

PLoS One. **2014** Dec 17;9(12):e114864

\* Ces deux auteurs ont contribué de façon égale à ce travail

RESEARCH ARTICLE

# Stubborn Contaminants: Influence of Detergents on the Purity of the Multidrug ABC Transporter BmrA

Benjamin Wiseman<sup>1,2,3</sup>, Arnaud Kilburg<sup>4</sup>, Vincent Chaptal<sup>4</sup>, Gina Catalina Reyes-Mejia<sup>1,2,3</sup>, Jonathan Sarwan<sup>1,2,3</sup>, Pierre Falson<sup>4\*</sup>, Jean-Michel Jault<sup>1,2,3,✉</sup>

1. Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), 6 rue Jules Horowitz, F-38000, Grenoble, France, 2. CEA, DSV, IBS, F-38000, Grenoble, France, 3. CNRS UMR5075, IBS, F-38000, Grenoble, France, 4. Drug Resistance Mechanism and Modulation team, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), UMR5086 CNRS/Université Lyon 1, 7 passage du Vercors, F-69367, Lyon, France

\*pierre.falson@ibcp.fr (PF); jean-michel.jault@ibcp.fr (JMJ)

✉ These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: IBCP, UMR5086 CNRS/Université Lyon 1, 7 passage du Vercors, F-69367, Lyon, France



## OPEN ACCESS

Citation: Wiseman B, Kilburg A, Chaptal V, Reyes-Mejia GC, Sarwan J, et al. (2014) Stubborn Contaminants: Influence of Detergents on the Purity of the Multidrug ABC Transporter BmrA. PLoS ONE 9(12): e114864. doi:10.1371/journal.pone.0114864

Editor: Sheng Ye, Zhejiang University, China

Received: August 5, 2014

Accepted: November 13, 2014

Published: December 17, 2014

Copyright: © 2014 Wiseman et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. The data for the OmpF structure have been deposited in the PDB (accession N<sup>o</sup> 4JFB).

Funding: PF was supported by the Ligue Contre le Cancer and by ANR-EMMA-10-049-01 and ANR-13-BSV5-0001-01. JM and PF were supported by the ANR-09-PIRI-0002-01 and the ANR-14-CE09-0024. Arnaud Kilburg is a recipient of a doctoral fellowship from 'région Rhône-Alpes' and Jonathan Sarwan was a recipient of a doctoral fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer; their financial support is gratefully acknowledged. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Despite the growing interest in membrane proteins, their crystallization remains a major challenge. In the course of a crystallographic study on the multidrug ATP-binding cassette transporter BmrA, mass spectral analyses on samples purified with six selected detergents revealed unexpected protein contamination visible for the most part on overloaded SDS-PAGE. A major contamination from the outer membrane protein OmpF was detected in purifications with Foscholine 12 (FC12) but not with Lauryldimethylamine-N-oxide (LDAO) or any of the maltose-based detergents. Consequently, in the FC12 purified BmrA, OmpF easily crystallized over BmrA in a new space group, and whose structure is reported here. We therefore devised an optimized protocol to eliminate OmpF during the FC12 purification of BmrA. On the other hand, an additional band visible at 110 kDa was detected in all samples purified with the maltose-based detergents. It contained AcrB that crystallized over BmrA despite its trace amounts. Highly pure BmrA preparations could be obtained using either a DacrAB *E. coli* strain and n-dodecyl-β-D-maltopyranoside, or a classical *E. coli* strain and lauryl maltose neopentyl glycol for the overexpression and purification, respectively. Overall our results urge to incorporate a proteomics-based purity analysis into quality control checks prior to commencing crystallization assays of membrane proteins that are notoriously arduous to crystallize. Moreover, the strategies developed here to selectively eliminate obstinate contaminants should be applicable to the purification of other membrane proteins overexpressed in *E. coli*.

## Introduction

Membrane proteins play a pivotal role in the cells as they orchestrate the exchange of information, nutrients or waste with the external milieu. They constitute about one third of the proteome in each living organism, and given their vital role, they are targeted by the majority of the drugs currently on the market [1]. Yet, despite recent advances in protein expression and purification technologies, they remain one of the most difficult groups of proteins to study. Crystallization in particular remains a challenging endeavor and while some success has been achieved recently [2, 3], producing sufficient quantities of highly pure and homogenous samples suitable for crystallization continues to be a major stumbling block for most membrane proteins. Choosing the correct detergent for solubilization and purification is integral to this process. A search of the Membrane Protein Data Bank revealed that n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM), n-dodecyl-N,N-dimethylamine-N-oxide (LDAO), and octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OG) have been the three detergents most successfully used for the solubilization, purification, and crystallization of membrane proteins [4]. Although these detergents are a good starting point, typically many detergents need to be screened before the best ones are chosen for a protein of interest. Detergent screens are normally accomplished by various quality control tests including functional assays, monitoring the sharpness and symmetry of the SEC profile, and purity by SDS-PAGE and only the detergents that produce highly pure and monodispersed samples are kept for further crystallization trials [5]. In this way many detergents can be quickly screened in a high-throughput manner ensuring that only the best samples with the highest probability of crystallization are used.

Obtaining pure protein is key to this process. Purity is usually assessed simply by visualization on SDS-PAGE and as a result many contaminating proteins can be potentially overlooked either by migrating at the size of the target protein or being present as trace amounts not easily spotted. There have been several reports of minute contaminants being accidentally crystallized during initial screening for crystallization conditions [6–12], resulting in the waste of time and resources, pursuing initially encouraging but ultimately false leads. Typically, analyses of purified protein for contaminants are only conducted after attempts at structure determination using models of the target protein have failed. Incorporating a proteomics-based purity analysis into quality control checks [13], prior to commencing crystallization trials can be a fast and cost effective method for minimizing the crystallization and time wasted on structure determination of contaminants. Although, crystallization is in itself a purification step and trace contaminants will always be present, purifications with too many contaminants can be reassessed with improved protocols before commencing crystallization trials. At the very least if the identity of the contaminants are already known, they can be quickly checked by SDS-PAGE against any new diffracting crystals.

Recently the use of fluorescence size-exclusion chromatography (FSEC) [14, 15] and multicolor fluorescence size-exclusion chromatography (MC-FSEC) [16], has created the ability to screen detergents and other buffer parameters in a high-

throughput manner allowing scientists to screen potentially hundreds of combinations in a fraction of the time compared to traditional SEC methods. With the use of fluorescence tags such as the green fluorescent protein (GFP) one can monitor the location, expression levels, monodispersity, approximate molar mass [15] and thermal stability [17] of the target membrane protein using nanogram or less quantities of either purified or unpurified protein. However since these methods only require nanograms or less of the target protein compared to milligrams or micrograms using traditional SEC methods trace contaminants that could interfere or crystallize over the target protein might be easily overlooked.

BmrA (*Bacillus* multidrug resistance ATP) is a *Bacillus subtilis* multidrug transporter that belongs to one of the largest families of membrane proteins known as the ATP-binding cassette (ABC) proteins. In this family, membrane transporters are responsible for either the uptake or export of many different substrates across membranes. Among exporters, some efflux a wide array of molecules including anti-cancer drugs and antibiotics implicating them in multidrug resistance (MDR) phenotypes in human cancers cells and pathogenic bacteria, respectively [18]. ABC transporters share a common core architecture consisting of two soluble nucleotide-binding domains and two transmembrane domains that couple ATP binding and hydrolysis with the transport of molecules across a membrane and against a concentration gradient [19]. Despite several reported structures of exporters [20–24] many questions remain unanswered about the exact mechanism of substrate recognition and drug efflux.

Producing highly pure protein suitable for crystallization trials is the first step in attempting to solve new high-resolution structures of any protein. Because BmrA can be expressed in large amounts in *E. coli* [25] and is easily purified in a functional state [26], this makes this transporter a suitable target for structural approaches. First, given the high yield of solubilized protein, the detergent FC12 was initially chosen to purify and crystallize BmrA. This unfortunately led to the crystallization of the contaminant OmpF in a new space group that is reported here. Therefore, we selected six further detergents to study the solubilization and purity of the extracted BmrA. The homogeneity of the seemingly purified transporter preparations was analyzed by mass spectrometry for each detergent used. Despite a standard two-step purification protocol involving nickel affinity and size exclusion chromatographies, multiple contaminants were still detected, although present in trace amounts for most of them. The use of maltose-based detergent to purify BmrA allowed us to avoid the contamination by OmpF but AcrB was present as a minor contaminant and thus crystallize instead of BmrA. In this report, strategies to overcome these unfortunate scenarios are proposed that could be directly applicable to other membrane proteins overproduced in *E. coli* for functional and/or structural purposes.



## Materials and Methods

### Expression and solubilization of BmrA with different classes of detergent

BmrA was cloned with a 6-histidine N-terminal tag, overexpressed in C41(DE3) *E. coli*, unless otherwise specified, and membrane fraction containing overexpressed BmrA was prepared as previously described [25]. A set of non-ionic and zwitterionic detergents were chosen to determine which type of detergent was most effective for BmrA extraction. Solubilization screen was conducted in 500 mL total volume mixtures with membranes diluted to 5 mg/mL and solubilized at a detergent concentration of 1% (w/v) in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl and anti-proteases tablets (Roche), with the following detergents: n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM), n-undecyl- $\beta$ -D-maltoside (UDM), n-undecyl- $\beta$ -D-thiomaltoside (UTM), lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG), decyl maltose neopentyl glycol (DMNG), octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (OG), 6-cyclohexyl-1-hexyl- $\beta$ -D-maltoside (Cymal 6), Lauryldimethylamine oxide (LDAO) and zwitterionic n-dodecylphosphocholine (FC12), and n-Hexadecylphosphocholine (FC16). After incubation for 2 h at 4°C, soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 180,000 g for 60 min. Insoluble material was suspended in buffer and equivalent protein concentrations were analyzed by 10% SDS-PAGE.

### Purification of BmrA in FC12

Membranes containing overexpressed BmrA were solubilized at 2 mg/mL by gentle mixing in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 0.02 mM EDTA and anti-protease tablets (Roche) with 1% (w/v) of FC12 for 2 h at 4°C. Insoluble material was removed by ultracentrifugation at 100,000 g for 1 h at 4°C. The supernatant containing the solubilized BmrA was diluted 2 times with buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% FC12 and anti-protease tablets) and loaded at a flow rate of 2 mL/min onto to a 5 mL pre-equilibrated Q-Sepharose ion exchange column (GE Healthcare). After washing with 10 mL of buffer A, proteins were eluted by a gradient from 0 to 100% with 50 mL of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 0.5% FC12 and fractions of 1 mL were collected. The fractions containing BmrA were pooled and loaded onto a 5 mL HiTrap chelating HP column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.3% FC12 and anti-protease tablets). After washing with 50 mL of buffer B, the elution was made by a linear gradient from 0 to 100% with 30 mL of buffer C (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 500 mM imidazole, 0.3% FC12 and anti-proteases tablets). The eluted fractions containing BmrA were pooled and dialysed overnight at 4°C, using a 50 kDa cut-off, and against 1 L of buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl and 0.15% FC12. Finally, BmrA was concentrated to 20 mg/mL by centrifugation at 4,000 g on an Amicon ultrafiltration device (MWCO 50 kDa, Millipore).

## Purification of BmrA with a set of six selected detergents

When BmrA was solubilized from the membranes and purified with a set of six selected detergents (DDM, UDM, UTM, LMNG, FC12, and LDAO) all purification steps were carried out at 4 °C. Membranes containing overexpressed BmrA were solubilized with 1% of each detergent with gentle mixing for 90 min in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM imidazole, 1 mM PMFS, and anti-protease tablets (Roche). Following centrifugation at 100,000 g for 60 min to remove non-solubilized proteins, the supernatant was incubated with gentle mixing for 60 min with 1–2 mL of equilibrated Ni<sup>2+</sup>-NTA resin. Bound protein was washed with 100 volumes of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM PMSF, EDTA-free anti-protease tablets and detergent (0.05% DDM, 0.2% UDM, 0.05% UTM, 0.02% LMNG, 0.2% LDAO, or 0.3% FC12). After washing, bound protein was eluted from the Ni<sup>2+</sup>-NTA resin with 2–3 volumes of 250 mM imidazole in the same buffer. Finally, BmrA was purified by SEC/FPLC on a HiLoad 16/60 Superdex 200 PG column (GE Healthcare) equilibrated with 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, and detergent (0.02% DDM, 0.1% UDM, 0.03% UTM, 0.005% LMNG, 0.1% LDAO, or 0.15% FC12). Fractions corresponding to BmrA dimers were pooled and concentrated using a 100 kDa MWCO filter (Millipore), flash frozen in 100 nL aliquots in liquid nitrogen and kept at -80 °C, if not used immediately for analysis.

## Mass spectrometry analyses of fractions containing purified BmrA

The purity of BmrA samples was analyzed by overloading a 10% SDS-PAGE in order to detect the presence of contaminants in addition to the protein of interest. Samples were incubated at 37 °C and approximately 15 ng of purified protein were resolved on SDS-PAGE gels and visualized with Coomassie Brilliant Blue. Visible bands were cut out and protein(s) within these bands were identified from their fragments generated by in-gel trypsin digestion followed by MALDI-TOF mass spectrometry [13].

## Crystallization and structure resolution

Crystallization trials were carried out using the crystallogensis platform at the IBCP or the High Throughput Crystallization Laboratory at the EMBL Grenoble [27], using the vapor diffusion technique on hanging drops over 96 well plates to search for initial hits. Crystals were then manually optimized in 24 well plates. Final optimized conditions were as follows: BmrA at 10 mg/mL, incubated with 5 mM ADP for 30 min on ice and mixed in a 1:1 ratio with a reservoir solution containing 18–22% PEG 1500, 5–10% 2-Methyl-2,4-pentanediol and 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 at 19 °C. Crystals appeared overnight with a high variation in nucleation profiles. Large crystals were harvested, cryo-protected by a quick dip in a solution containing the well solution supplemented by 10% glycerol, and flash cooled in liquid nitrogen.

Diffraction screening was performed on ID23-1 and ID14 beamlines at ESRF and Proxima-1 at SOLEIL, respectively, and data were collected on beamline ID23-1 at ESRF. Data came from a single rod-shaped crystal shot at two distinct locations and merged. Data was processed using Mosfilm [28] and scaled using Aimless [29]. Phases were obtained by molecular replacement using Phaser [30] in the phenix 1.8.1-1168 package [31] to use the latest version able to handle translational pseudosymmetry, using a trimer of OmpF as a search model (PDB: 2ZFG). The structure was refined using phenix.refine [32] using restrained refinement with group B refinement (two groups per residue) and TLS (1 TLS group per chain), and manual rebuilding in Coot [33]. Non-crystallographic symmetry was used throughout the refinement.

## Results and Discussion

### Extraction of BmrA using a panel of detergents

The choice of a detergent for solubilization of a membrane protein is a critical parameter for its subsequent purification, and although previous studies have shown that BmrA can be purified in a functional state by using DDM [26, 34–36], we have revisited this step to ascertain whether this detergent is the most appropriate to get the highest possible yield of BmrA in a state as pure and stable as possible. Thus, we compared the extraction efficiencies of BmrA using several non-ionic detergents: DDM, UDM, LMNG, DMNG, OG, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> and Cymal 6, and zwitterionic detergents: FC12 and FC16; SDS was used as a positive control for a maximal extraction efficiency (Fig. 1). As expected, SDS was found to extract the largest amount of protein from the membrane while OG and C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> were poorly efficient, leading to a very low recovery of BmrA in the supernatant similar to that found in the sample incubated with the buffer only. For OG, this result contrasts with many *E. coli* membrane proteins that are normally efficiently solubilized by this particular detergent [37]. The lipid-like surfactants FC12 and FC16 were almost as good as SDS with, 90% of BmrA being solubilized. In contrast, DDM and the other sugar-based detergents extracted less than half of the total protein. Several examples in the literature like LmrA [38], BmrC/D [39], ABCG2 [40], ABCB4 and ABCB11 [41], and ABCA4 [42] have shown the preference of ABC transporters, or membrane proteins in general [37], for foscholine detergents in solubilization screens. Thus, based on its high efficacy in this solubilization screen, we chose to pursue with FC12 as the detergent of choice for purification of BmrA for structural studies.

### Purification of BmrA in FC12

BmrA was extracted from the membranes with 1% FC12 and loaded onto an anion exchange resin. After a washing step, proteins were eluted from the column with the addition of 0.6 M NaCl (Fig. 2A). BmrA was found in the first peak, while the second peak most likely contained nucleotides based on the high 260/

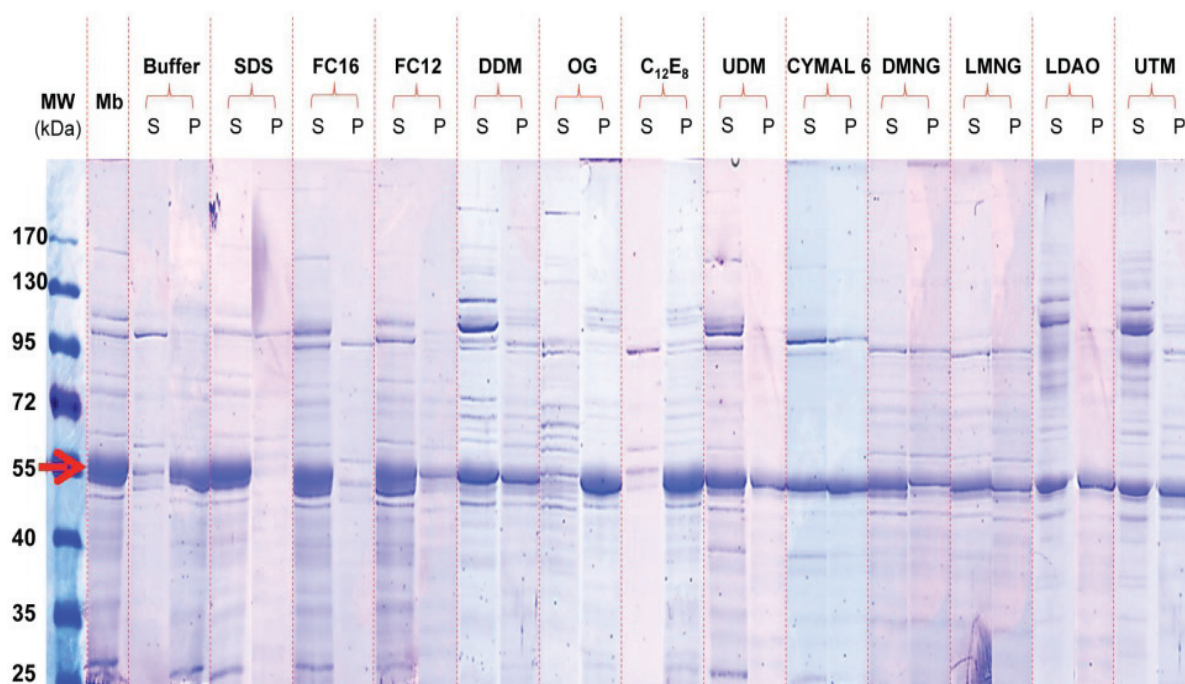


Fig. 1. Extraction of BmrA in *E. coli* membrane with 1% (w/v) detergents. After solubilization with the indicated detergent, extracted and non-extracted materials were separated by ultracentrifugation, and the supernatant (S) and pellet (P) were resolved on a 10% SDS-PAGE. Fifteen  $\mu$ l of soluble and insoluble fractions were loaded (, 75  $\mu$ g of protein). Positive control experiment was carried out with sodium dodecyl sulfate (SDS) and negative control was carried out without detergent (buffer alone). Mb: the membrane fraction. Red arrow indicates the position of BmrA.

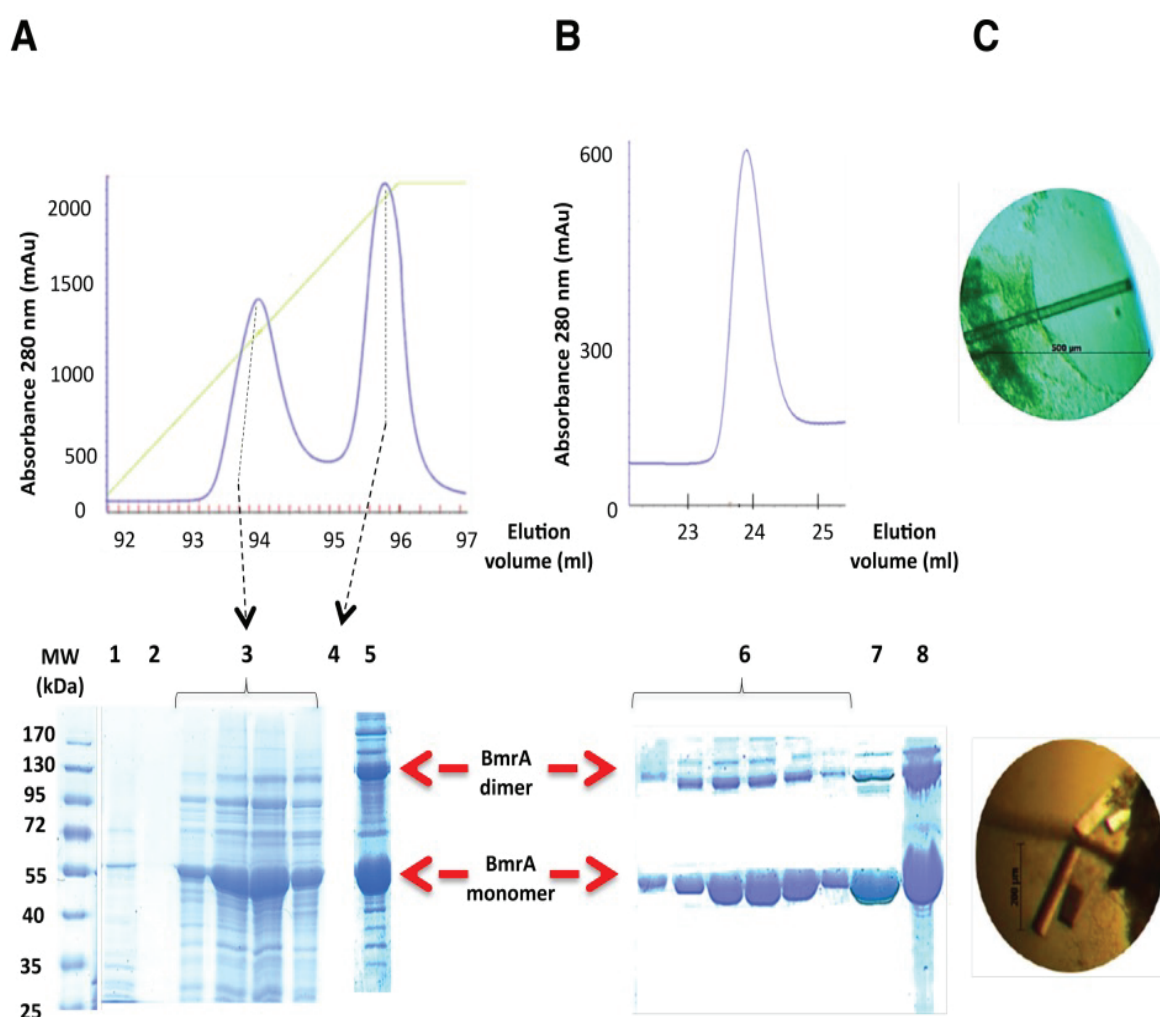
doi:10.1371/journal.pone.0114864.g001

280 ratio. The band observed at approximately 130 kDa corresponds to BmrA dimers that are resistant to denaturing conditions of SDS-PAGE. Fractions containing BmrA were then pooled, loaded onto a  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarose column and BmrA was eluted with the addition of 0.5 M imidazole (Fig. 2B). The chromatogram and corresponding SDS-PAGE showed that BmrA was eluted in a homogeneous peak, thin and symmetrical, that still contains some SDS-resistant BmrA dimers. Peak fractions were pooled, dialyzed to reduce the concentration of FC12 to 0.15%, and then concentrated to 20 mg/mL. The concentration of FC12 was quantified to 3.5% by a method developed in our laboratory (Chaptal et al., in preparation). This purification protocol yielded approximately 8 mg of BmrA from five liters of culture.

### Crystallization of the purified protein

Initial screens carried out using the PEG I and II suites led to several positive hits appearing in one week. The best one led to colorless rod shaped crystals reaching about 1.06 0.26 0.1 mm in size, and were obtained for BmrA that was co-crystallized with 5 mM ADP, which diffracted to 3.8Å (Fig. 2C, S1 Table). Surprisingly, molecular replacement attempts with structures of different ABC exporters did not lead to any solution despite the wealth of different conformations available. To assess the presence of BmrA within the crystals, we





**Fig. 2.** Purification and crystallization of BmrA protein in FC12. **A**, elution of FC12 solubilized BmrA protein from a Q sepharose fast flow column. The absorbance of the protein was monitored at 280 nm and BmrA was eluted from the column with 600 mM NaCl. BmrA fractions were resolved on 10% SDS-PAGE. Lane 1, loading step. Lane 2, washing step. Lanes 3 and 4, protein eluted during the NaCl gradient. Lane 5, pool. Red arrows indicate the positions of the BmrA dimer and monomer. **B**, elution of BmrA from a  $\text{Ni}^{2+}$  high trap chelating column. SDS-PAGE, Lane 6, peak fractions. Lane 7, pool. Lane 8, concentrated pool. **C**, crystals obtained at 20°C by the vapor-diffusion hanging drop method with 2  $\mu\text{l}$  of 10 mg/ml purified BmrA and 2  $\mu\text{l}$  of the reservoir solution (18% polyethylene glycol 1500, 10% 2-methyl-2,4-pentanediol and 100 mM Tris-HCl pH 8.0).

doi:10.1371/journal.pone.0114864.g002

harvested a large number of crystals after careful washing in several drops of crystallization solution, and identified their content on SDS-PAGE (Fig. 3A). A band migrating above the apparent molecular mass of BmrA was observed, and sequencing by mass spectrometry unambiguously revealed that the protein present in this band was in fact OmpF (S2 Table).

OmpF migrated with an apparent unusual size, 60–70 kDa, while the protein was expected to migrate at 40 kDa. In addition, the corresponding band of OmpF was not observed in the BmrA purified fraction (Lane 1). This result led us to analyze more carefully the other bands of the purified fraction (see below). Once OmpF was identified in the crystals, the molecular replacement gave a solution. Crystals belonged to the monoclinic space group C 2 and contained two



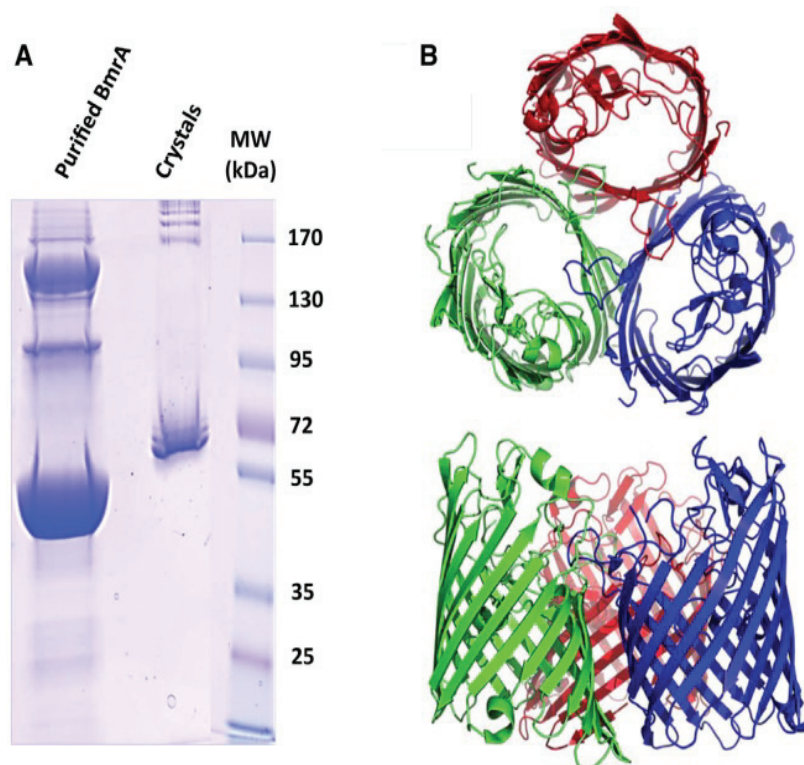


Fig. 3. Crystallization of OmpF in the detergent FC12 purified BmrA sample. A, purified BmrA in FC12 and 25 washed OmpF crystals were resolved on a 10% SDS-PAGE. B, crystal structure of an OmpF trimer in two orientations related by a 90° rotation (each monomer is shown in different colors).

doi:10.1371/journal.pone.0114864.g003

trimers in the asymmetric unit. The diffraction data sets were refined to 3.8 Å (S1 Table).

### Purification of BmrA with six selected detergents

Given the propensity of FC12 to co-extract and co-purify OmpF with BmrA, we re-examined our choice of the detergent used for the purification. From the solubilisation screen (Fig. 1), several maltose-based detergents (i.e. DDM, UDM, UTM and LMNG) plus LDAO were selected for further study and FC12 was kept as a control due to its high efficacy of extraction. After solubilisation and nickel affinity chromatography, BmrA containing fractions were pooled and analyzed by gel filtration. It should be noted that in the construct used here BmrA contained a His-tag fused at its N-terminus whereas previous purification protocols were carried out with a His-tag fused at the C-terminus of the protein [26, 34, 35, 43]. This, however, does not seem to impact neither on the expression yield nor on the retention of the protein on the nickel column; this latter property shows that the affinity tag is equally accessible in both constructs. Samples solubilized and purified in DDM, UDM, UTM, FC12, LDAO, and LMNG all eluted from the gel filtration column at the volume corresponding to the expected elution time for BmrA dimers in detergent micelles (Fig. 4, peaks at , 60–62 mL), consistent with

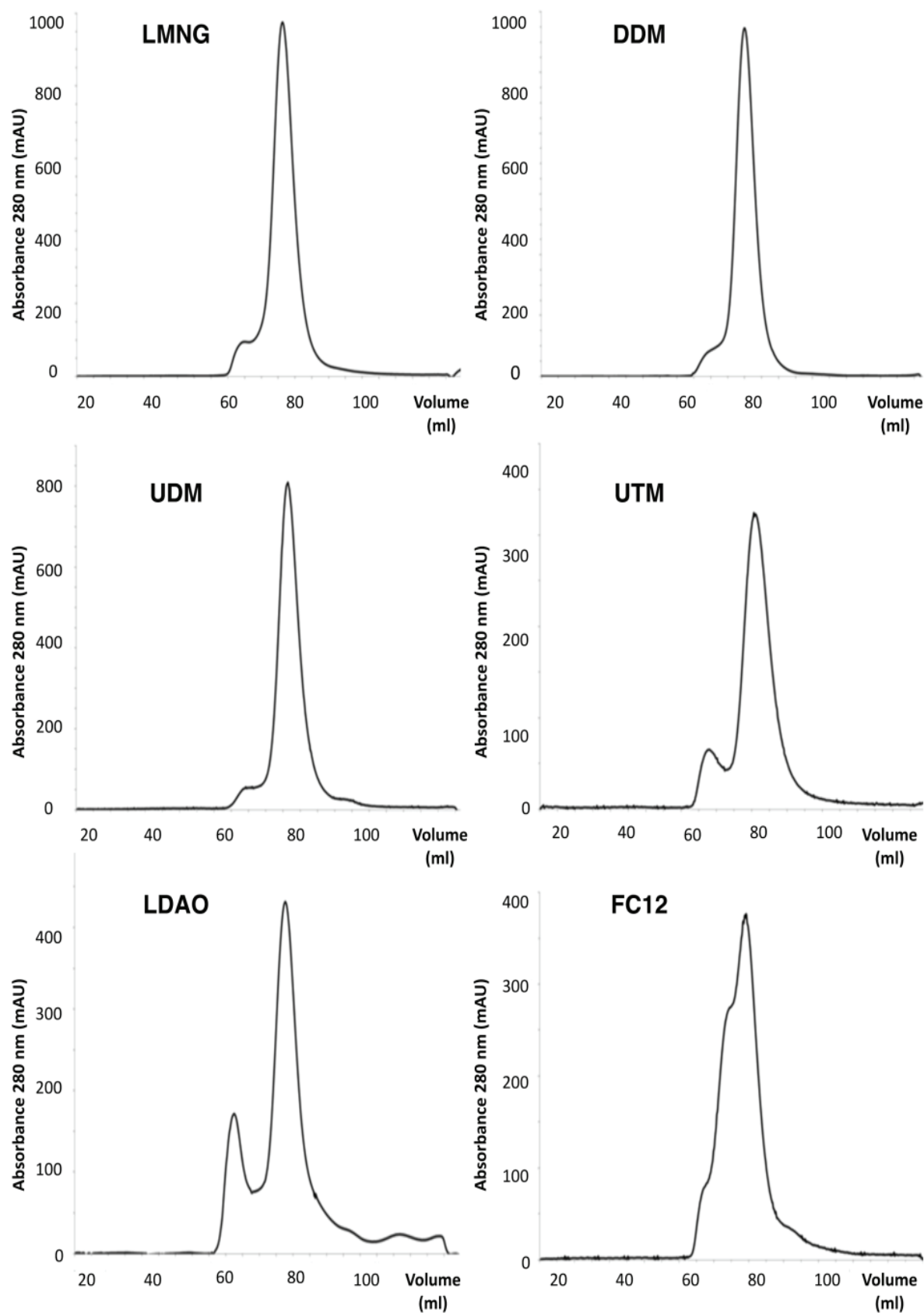


Fig. 4. Size exclusion chromatography profiles of BmrA purified in six selected detergents. BmrA was solubilized from *E. coli* membrane and purified with the detergents as indicated in the figure.

doi:10.1371/journal.pone.0114864.g004

previous studies of BmrA purified in DDM [43] and two related bacterial transporters also purified in DDM [39,44]. The four maltose-based detergents, LMNG, DDM, UDM, and UTM, all yielded a similar amount of aggregation as seen by a small shoulder at approximately 50 mL with the maximum of, 10% in UTM. In LDAO, dimers of BmrA had a slightly retarded elution of 62 ± 0.5 mL consistent with a smaller micelle size [45] and generally higher aggregation of about 30%. Purifications with FC12 on the other hand yielded a broader SEC profile with two distinct shoulders at about 47 mL, 55 mL, and the maximum at 60 ± 0.5 mL.

In order to detect the possible contaminants that co-purify with BmrA, samples obtained from each of the six purification protocols were deliberately overloaded (15–20 µg of proteins) and resolved by SDS-PAGE (Fig. 5A). Indeed, a gel performed in a standard way with 5 µg of proteins loaded (Fig. 5B) revealed a seemingly pure BmrA preparation for all detergents tested but FC12 and LDAO and to a lesser extent DDM. A predominant band with an apparent molecular mass of, 55 kDa and corresponding to BmrA was observed in all cases but for the FC12 purification where additional bands of higher apparent molecular weights were also clearly visible (Fig. 5A). The four maltose-based detergents LMNG, DDM, UDM, and UTM also had similar contamination-like patterns with additional bands at approximately 150, 110, 45 and 34 kDa and in the case of DDM extra bands at 115 and 40 kDa (Fig. 5A). The 'contaminating' and/or degradation bands in the maltose-based detergents appear negligible as compared to the main band of BmrA representing probably no more than a few percents in total (Fig. 5B). Purifications in LDAO contained the same two bands at 110 and 150 kDa seen in the maltosides, and four other weaker bands. LDAO purifications also did not contain the same pattern below the BmrA band at 55 kDa with only a single band visible at 34 kDa compared to two with the maltoside-based detergents, and no visible band directly below the BmrA band at 45 kDa. Purifications in FC12 displayed a unique pattern compared to the other detergents and does not have any bands in common other than the main BmrA band. Notably, the three top bands are in a much higher ratio to the BmrA band at approximately 10, 70, and 20% respectively. Interestingly, there were no visible bands below the main BmrA band in purifications in FC12. It is important to note here that the two FC12 samples analyzed in panels A and B (Fig. 5) came from two different purification protocols. In panel A, the sample was the one used for crystallization trials and was subjected to two columns, DEAE plus Ni-agarose, before being concentrated up to 20 mg/mL whereas sample from panel B was treated as for the other detergents with a Ni-agarose column followed by a gel filtration. This is presumably why less BmrA 'oligomeric forms' were detected in panel B (see below).

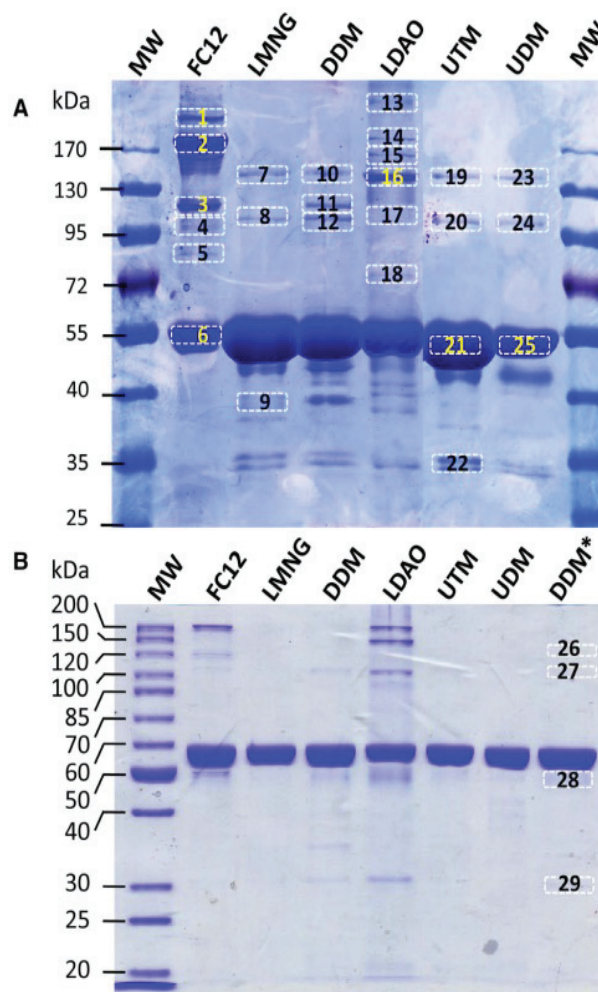


Fig. 5. SDS-PAGE of the purified BmrA. A, 10% SDS-PAGE of 15 ng of purified BmrA in the detergents as indicated in the figure. The numbered bands were cut out and their trypsin digested products were analyzed by LC-MS/MS (see table 1). B, 10% SDS-PAGE of 5 ng of purified BmrA in the detergents as indicated in the figure. \*BL21(DE3)DacrAB, DacrEF was used for the overexpression of BmrA. Please note that samples for FC12 in panels A and B were obtained from two different purifications protocols (see the text).

doi:10.1371/journal.pone.0114864.g005

### Impurity identification by mass spectrometry

Table 1 summarizes the detected 'contaminants' in the six detergent purified samples. Western blot analysis revealed that the majority of the bands were either aggregates and/or oligomeric forms of BmrA in the case of the bands above the 55 kDa band or degraded products in the case of the bands below the 55 kDa band (not shown). However, further analysis with mass spectrometry revealed that many of the additional bands contained multiple proteins along with BmrA. For example, the bands at 45 and 40 kDa (bands 14 and 15) in the DDM sample contained 11 and 5 additional detectable proteins, respectively, although BmrA appears to be present in large excess in these two bands. Also, while the main bands at 55 kDa of UTM and UDM were pure, the upper bands contained 4 and 8

Table 1. Impurity identification of purified BmrA in the various detergents.

Detergent	Band <sup>a</sup>	Score	# of Peptides	Coverage (%)	Mw (kDa)	Accession #	Name	
FC 12	1 (230 kDa)	2 204	59	21	64.5	O06967	BmrA	
		361	13	15	39.3	P02931	Outer membrane protein F (OmpF)	
	2 (180 kDa)	19 119	402	44	64.5	O06967	BmrA	
		246	4	7	39.3	P02931	OmpF	
	3 (120 kDa)	14 785	442	44	64.5	O06967	BmrA	
		6 760	235	53	39.3	P02931	OmpF	
	4 (110 kDa)	510	12	18	64.5	O06967	BmrA	
		217	7	15	39.3	P02931	OmpF	
	5 (85 kDa)	591	19	19	82.1	P05825	Ferrienterobactin receptor (fepA)	
		306	9	13	64.5	O06967	BmrA	
		116	3	8	39.3	P02931	OmpF	
	6 (55 kDa)	9 119	209	60	64.5	O06967	BmrA	
		2 164	63	52	82.1	P05825	fepA	
		1 163	34	57	39.3	P02931	OmpF	
LMNG	7 (150 kDa)	429	14	22	64.5	O06967	BmrA	
	8 (110 kDa)	196	4	3	113.5	P31224	Acriflavine resistance protein B (AcrB)	
	9 (45 kDa)	188	5	10	64.5	O06967	BmrA	
DDM	10 (150 kDa)	108	2	5	64.5	O06967	BmrA	
	11 (120 kDa)	185	3	5	64.5	O06967	BmrA	
	12 (110 kDa)	418	8	7	113.5	P31224	AcrB	
114		2	5	64.5	O06967	BmrA		
LDAO	13 (250 kDa)	327	14	13	64.5	O06967	BmrA	
	14 (180 kDa)	596	18	20	64.5	O06967	BmrA	
	15 (170 kDa)	466	11	13	64.5	O06967	BmrA	
	16 (150 kDa)	18 727	475	50	64.5	O06967	BmrA	
		2 428	70	26	34.9	P0ABJ2	Cytochrome ubiquinol oxidase sub. 2	
		297	5	6	74.3	P0ABJ0	Cytochrome ubiquinol oxidase sub. 1	
	17 (110 kDa)	104	3	5	64.5	O06967	BmrA	
	18 (75 kDa)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	UTM	19 (150 kDa)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		20 (110 kDa)	1 836	44	21	113.5	P31224	AcrB
	421		11	8	99.6	P0AFG9	Pyruvate dehydrogenase E1 component	
		222	4	3	114.6	Q8FK36	Cation efflux system protein (CusA)	
		158	3	3	105.0	P0AFG5	2-oxoglutarate dehydrogenase E1	
	21 (55 kDa)	15 230	427	57.2	64.5	O06967	BmrA	
	22 (35 kDa)	227	5	16	36.3	A7ZP72	Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase	
UDM	23 (150 kDa)	177	8	7	64.5	O06967	BmrA	



Table 1. Cont.

Detergent	Band <sup>a</sup>	Score	# of Peptides	Coverage (%)	Mw (kDa)	Accession #	Name
		102	2	13	34.9	P0ABJ2	Cytochrome ubiquinol oxidase sub. 2
		95	2	8	36.3	A7ZP72	Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase
	24 (110 kDa)	3 204	65	19	113.5	P31224	AcrB
		1 574	51	26	99.6	P0AFG9	Pyruvate dehydrogenase E1
		638	19	11	105	P0AFG5	2-oxoglutarate dehydrogenase E1
		351	9	9	64.5	O06967	BmrA
		254	6	5	102.0	A7ZHI9	Protein translocase subunit (SecA)
		158	3	3	99.4	P0ABB9	Magnesium-transporting ATPase
		120	4	4	114.6	Q8FK36	CusA
	25 (55 kDa)	34 422	903	61	64.5	O06967	BmrA
DDM*	26 (150 kDa)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	27 (110 kDa)	95	5	4	99.6	P0AFG9	Pyruvate dehydrogenase E1
		90	2	2	105	P0AFG5	2-oxoglutarate dehydrogenase E1
	28 (50 kDa)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup>band numbering correspond to the bands cut out from the 10% SDS-PAGE in Fig. 5. The apparent molecular weights as estimated by migration on the gel are indicated in parenthesis. n.d., no protein detected. The score is a protein quality identification index, considering the number of peptide sequences and MS/MS spectra that have been identified for each protein.

doi:10.1371/journal.pone.0114864.t001

contaminating proteins, respectively. It is interesting to note that for the undecyl-maltosides all the contaminants detected in UTM were also seen in UDM. And aside from the well-known contaminant acriflavine resistance protein B (AcrB), which was detected in all the maltoside samples, purifications with DDM only had ubiquinol oxidase and undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase in common with UTM and UDM.

Purification with LMNG was remarkably pure with only AcrB being detected in the 110 kDa band. The detection of BmrA in the 150 kDa band is consistent with SDS-resistant dimers. Its detection in the other bands at 110 kDa and 120 kDa in DDM and UDM suggests a small amount of aggregation and/or some degradation of BmrA dimers.

Purification in FC12 contained qualitatively few contaminating proteins when compared to purifications in the other detergents, except LMNG, although the outer membrane porin OmpF was detected in all analyzed bands. In addition the outer membrane receptor ferrienterobactin was detected in the main BmrA band at 55 kDa and band 5 at 85 kDa. Detection in band 5 is consistent with the expected mass of Ferrienterobactin of 82.1 kDa; however its detection in the main



BmrA band at 55 kDa suggests some degradation and/or non-specific interactions with BmrA.

The multiple bands of OmpF and BmrA observed in FC12 suggests aggregation and/or non-specific interaction and is consistent with the non-monodispersed SEC profile (Fig. 5), especially the large band at 180 kDa (band 2) that is roughly 70% of the main BmrA band. It is interesting to note here that OmpF contamination overlaps the migration pattern of BmrA perfectly. Unfortunately, the intense band at 120 kDa (band 3) with roughly 20% of the total intensity of the main BmrA band is consistent with both a BmrA dimer and an OmpF trimer making its initial detection difficult. Porins are known to be extremely stable proteins with the trimer able to withstand denaturation with 5 M guanidium hydrochloride or 2% SDS at 70 °C [46]. Thus, perhaps unsurprisingly, there is no visible band corresponding to an OmpF monomer, even on overloaded gels (Fig. 5A), that might have hinted at porin contamination. Indeed the strongest OmpF score of 10297 is observed in band 3 consistent with the OmpF trimer. The main BmrA band at 55 kDa also contains a relatively strong score of 1163 that could be consistent with an OmpF dimer, and even washed crystals migrated in a way consistent with an SDS resistant dimer (Fig. 3), albeit at a slightly larger size than the main BmrA band and despite attempts to denature the protein with 2% SDS. Due to the symmetry of the OmpF trimer [46], why a SDS resistant dimer would persist over the trimer is not readily obvious, although this might be due to some aberrant migration behavior of the trimer in SDS-PAGE.

Finally, purifications with LDAO contained 6 additional contaminating proteins. Notably, however, both AcrB and OmpF are absent. Similar to FC12, all analyzed bands in LDAO contained BmrA suggesting non-specific interactions with contaminating proteins. Unlike FC12, purifications in LDAO have a symmetrical mono-dispersed SEC profile similar to maltoside-based detergents (Fig. 4). Yet, a larger peak is observed in the void volume of the column as compared to maltoside-based detergents suggesting that BmrA is less stable in LDAO and aggregates over time. This is consistent with the smaller micelle size of LDAO that would potentially favor crystal contacts but also nonspecific aggregation. Like in the maltoside solubilized samples, there does not seem to be one overwhelming contaminant, although there is a particularly strong score of 2428 for the respiratory enzyme ubiquinol oxidase in the 150 kDa band (Fig. 5, band 16). Ubiquinol oxidase has been previously crystallized in octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside [47] and there are no reports of its accidental purification, although its presence along with the other contaminants would undoubtedly interfere with the crystallization of the target protein.

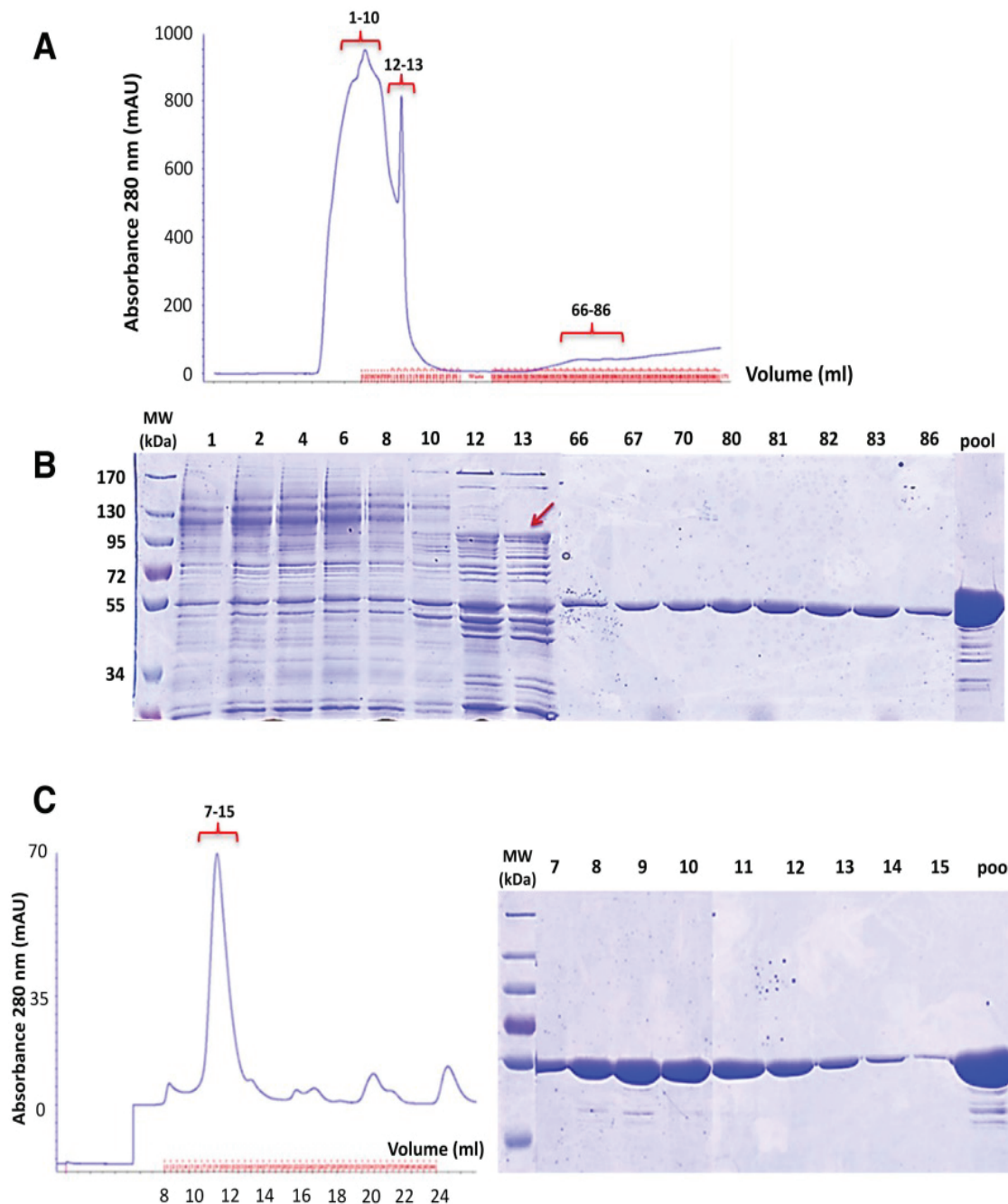
### How to get rid of OmpF and AcrB?

It is interesting that there are only two contaminating proteins in FC12 compared with nine in DDM. Since FC12 is one of the most effective membrane solubilizers [10], one might have expected to find more contaminating proteins when compared to DDM and other maltose-based detergents that are known to be less

effective, but this is not the case. Possibly, the lipid-like zwitterionic nature of FC12 is more effective at disrupting nonspecific interactions of other contaminating proteins with the  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA resin resulting in a cleaner purification. On the other hand, because FC12 solubilizes almost all BmrA present in the membrane in contrast to maltoside-based detergents that are less efficient, this might overwhelm the presence of contaminants in the purified samples.

Due to a histidine-rich cluster at its C-terminus AcrB is a well-documented contaminant in membrane protein purifications using  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA resins in their purification steps and has repeatedly been crystallized by accident [6, 7, 9]. In this study, AcrB was detected only in the maltoside-based detergent purified samples. And as a matter of fact, when DDM was used for the purification of BmrA, we did obtain crystals of proteins which turned out to be AcrB (not shown). Although there is no report of AcrB being crystallized with FC12, it is still surprising that it was absent considering the efficiency of FC12 membrane solubilization as well as the known affinity of AcrB with  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA. Since it is unlikely that AcrB is not solubilized with FC12, a possible explanation for its absence in the purified samples is that FC12 is acting somehow to disrupt its non-specific binding to the  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA. In all 26 reported structures of AcrB the detergent used for crystallization was a maltoside derivative with 24 being DDM [9] and the 2 others being Cymal-6 [48]. Consistent with observations by Psakis et al. [7], this might suggest that AcrB contamination and accidental crystallization is only problematic when using maltose-based detergents.

We developed three strategies in order to eliminate AcrB contamination. During DDM purification, using 50 mM imidazole in loading and washing buffers allowed to eliminate AcrB from the BmrA fractions (Fig. 6A). The gel filtration profile shows that BmrA was eluted in a homogeneous peak. SDS-PAGE confirmed the absence of AcrB in the pool, however we noticed the occurrence of some band below the main BmrA band at 55 kDa, perhaps due to some degradation. Alternatively, washing with FC12 could also be another possible solution for removing AcrB contamination from  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA resin during purifications. The second option would be to use a cleavable His-tag version of BmrA and to run a second  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA column to bind only the AcrB contaminant. Here, to avoid the cloning of BmrA in another vector with a cleavable tag, we took advantage of an observation we made when limited proteolysis experiment were conducted. Using trypsin, we were able to show that in a closed conformation of the transporter, namely using ATP/Mg plus vanadate for wild-type BmrA or ATP/Mg for an inactive E504Q mutant [34], it is possible to remove rather selectively the N-terminus of BmrA including the His-tag (Fig. 7A). Hence, after this cleavage by trypsin, the sequence of BmrA starts with  $\text{L}_{12}\text{KPFFA}$ ... When a short digestion with trypsin is performed on purpose, both the full-length and the untagged, cleaved, BmrA are resolved on a SDS gel (Fig. 7B). Then, running a second  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA column allows to recover the untagged BmrA in the flow through while the second peak eluted with imidazole contains a mixture of cleaved and full-length BmrA. This is very likely due to the fact that BmrA is a functional homodimer and part of these dimers in the second fraction contains a



**Fig. 6.** Strategy to eliminate the AcrB contamination. **A**, chromatogram of DDM-solubilized BmrA eluted from a  $\text{Ni}^{2+}$ -High Trap chelating column. The absorbance of the protein was monitored at 280 nm. The column was equilibrated and washed with 50 mM imidazole. **B**, purification of BmrA was analysed by 10% SDS-PAGE. Fractions 1–10: Proteins loaded on  $\text{Ni}^{2+}$ -High Trap chelating column, 12–13: BmrA washed with 50 mM imidazole, 66–86: BmrA eluted by linear imidazole gradient from 50 to 250 mM. The Red arrow indicates the position of AcrB. **C**, left panel, size exclusion chromatography of BmrA loaded onto a Superdex 200 10/300 GL column. Right panel, the fractions 7–15 collected from the size exclusion chromatography were resolved on a 10% SDS-PAGE.

doi:10.1371/journal.pone.0114864.g006

tagged, uncleaved, monomer and an untagged, cleaved, monomer. The pooled concentrated fractions show that in the first peak, containing untagged BmrA only, the AcrB contaminant is not present and it is only detected in the second

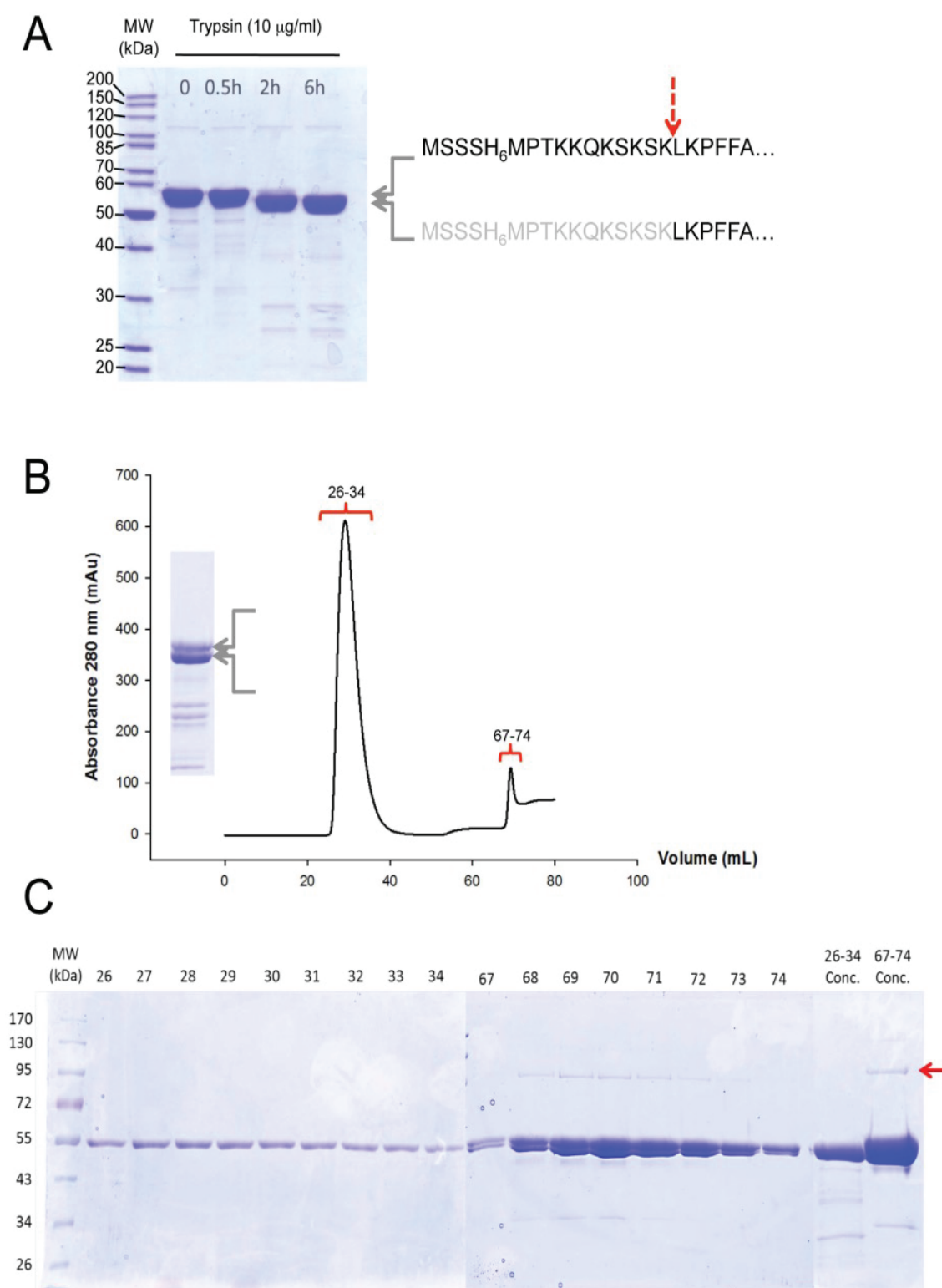


Fig. 7. The cleavage of the His<sub>6</sub>-tag at the N-terminus of BmrA allows the elimination of AcrB by a second Ni<sup>2+</sup>-NTA chromatographic step. A, The E504Q BmrA mutant was incubated with 2 mM ATP and MgCl<sub>2</sub> during 30 min 23 °C, and trypsin (10 ng/mL) was added. At the time indicated, an aliquot was withdrawn, mixed with the SDS-PAGE loading buffer and kept on ice before being submitted to electrophoresis. After 6 h of incubation with trypsin, the 'lower' band migrating just below the full-length BmrA was identified by Edman sequencing and shown to correspond to BmrA lacking its N-terminal extremity and starting at Leu(12)-Lys(13)-Pro(14)-Phe(15)-Phe(16)... Therefore the main cut with trypsin occurred between Lys(11) and Leu(12) and is



indicated by a red dashed arrow. B, After solubilization with DDM of membrane containing overexpressed E504Q BmrA mutant, extracted and non-extracted materials were separated by an ultracentrifugation and the supernatant was loaded onto a  $\text{Ni}^{2+}$  high trap chelating column followed by a PD-10 desalting column. The recovered E504Q BmrA mutant was incubated with 2 mM ATP and  $\text{MgCl}_2$  during 30 min and was submitted to trypsin digestion as in A. The incubation time was chosen to clearly see both the full-length, uncut protein, and BmrA with its N-terminal being cleaved (inset). The mixture was then submitted to a second  $\text{Ni}^{2+}$ -High Trap chelating column as before and the chromatogram of the protein eluted from the column and monitored at 280 nm is shown. The first peak, fractions 26–34, corresponded to the unbound proteins and the second peak, fractions 67–74, to the proteins eluted with 250 mM imidazole. C, the different fractions obtained in B were analyzed by 10% SDS-PAGE. The two last lanes correspond to fractions 26–34 and 83–90 which were pooled separately and concentrated on a centricon (MWCO 50 kDa) before being submitted to electrophoresis. The Red arrow indicates the position of AcrB.

doi:10.1371/journal.pone.0114864.g007

peak eluted in the presence of imidazole (Fig. 7C). So this general approach with a cleavable tag should be useful to get rid of some of the contaminants that naturally bind to  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA column.

The third simplest strategy would be to use, whenever possible, a DacB *E. coli* strain for the overexpression. This has been done here for BmrA using a BL21(DE3)DacAB, DacEF strain [49]. After solubilization with DDM, BmrA was purified by nickel affinity column and gel filtration and SDS-PAGE bands were analyzed by mass spectroscopy (Fig. 5B). Accordingly, the band 27 (, 110 kDa) shows the presence of two minor contaminants: pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase.

Similarly, despite an increase in expression of OmpF during overexpression of recombinant proteins in *E. coli* [10], out of the tested detergents OmpF was only detected in the FC12 purified sample. Given the efficiency of FC12 membrane solubilization, this is perhaps not surprising. However, unlike AcrB there is no histidine-rich cluster present in OmpF making the level of contamination a bit surprising. Even the addition of a Q-Sepharose column (GE Healthcare) step to the purification protocol was unsuccessful in removing OmpF contamination (not shown). There are 17 previously reported structures of OmpF with 14 being with n-Octyl-oligo-oxyethylene (octyl-POE), 1 with n-Octyl-b-D-Glucoside (b-OG), and 2 with FC12 [10], but none with maltosides. This could again suggest that, like AcrB contamination, washing the  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA resin with a maltose-based detergent might be a possible solution for removing OmpF contamination. Here, we tested the extraction of BmrA with varying concentrations of FC-12 from 0.24% (56 CMC) to 3.3% (706 CMC; Fig. 8). In contrast to higher ratios, lower ratios of FC-12 did not solubilize OmpF because its band at , 110 kDa was not detected anymore.

It should be noted that although OmpF was not detected in the maltosides or LDAO samples and AcrB was not detected in FC12 or LDAO samples we cannot rule out their presence. Veessler et al. [9] reported that AcrB was not detected by classical Coomassie-stained SDS-PAGE despite its accidental crystallization in attempts to crystallize the CorA transport protein. Similarly Psakis et al. [7] estimated that 100–500 pg of AcrB contamination in the crystallization drop was enough for crystallization. Therefore the only guaranteed method for an AcrB/OmpF free purified sample would be to start with overexpression using DacB and OmpF knockout strains.

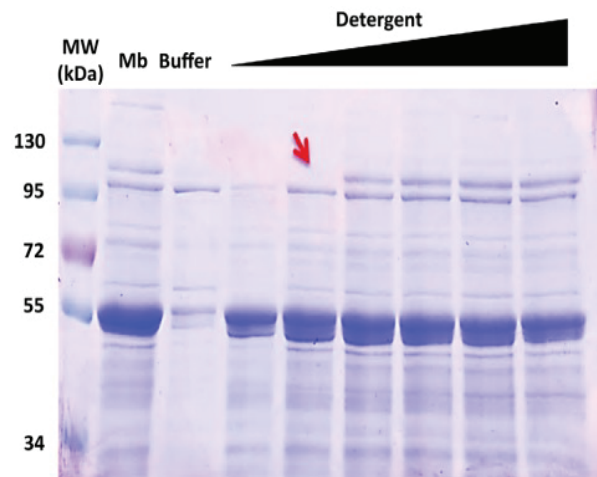


Fig. 8. Strategy to eliminate the OmpF contamination. Extraction of BmrA using increasing concentrations of FC12. The concentrations of FC12 used were, 0.24% (56 CMC), 0.5%, 0.9%, 1.4%, 2.4% and 3.3% (706 CMC). Extracted material was resolved on a 10% SDS-PAGE at equivalent protein concentrations. Mb: the membrane fraction, Buffer: control without detergent. The Red arrow indicates the position of OmpF which is expected to migrate as a trimer in the conditions used for the electrophoresis [46].

doi:10.1371/journal.pone.0114864.g008

### Lauryl maltose neopentyl glycol

Crystallization trials are usually performed on samples of the highest purity to firstly increase the probability of obtaining initial crystals and secondly to obtain well-ordered crystals that diffract strongly as even trace contaminant can have detrimental effects [50]. Although there has been a report of crystallization of a protein out of a mixture of over fifty without any predominating species [51], the probability of crystallizing the target protein in such a mixture would be extremely low.

An encouraging new class of amphiphiles that are based on the maltosides known as the maltose-neopentyl glycols, exemplified here by LMNG, has recently been developed [52] and have been shown to dramatically increase the stability of membrane proteins compared to traditional detergents. Also, it has been reported that detergent exchange into LMNG from DDM generated large enough crystals in the lipidic-cubic phase of two new forms of the GPCR  $\beta_2$ AR-T4L suitable for high-resolution diffraction while crystals were previously too small in DDM alone [52]. Similarly, three distinct conformations of  $\beta_2$ AR were observed by NMR in LMNG that could not be seen in DDM [53]. Remarkably, unlike the other maltosides, mass spectral analysis of the band at 55 kDa of BmrA solubilized and purified with LMNG detected only BmrA. The only contaminating protein detected was unsurprisingly AcrB in the 110 kDa band (Fig. 5, band 8 and table 1). This is very encouraging as purifications starting from enriched membranes of BmrA over-expressed in a  $\Delta$ acrAB strain would probably yield extremely pure protein. In addition to that, we compared the stability of BmrA in LMNG and in DDM. As shown in S1 Figure, almost no aggregates are detected in the LMNG purified sample after 6 days at room temperature in contrast to DDM



where a significant amount of aggregates is observed just after 3 days of storage. Together with the previous reports of enhanced stability and diffraction the results here further support the use of LMNG in membrane protein crystallization of ABC transporters. Producing highly pure and stable protein is generally accepted to be the two most important parameters in successful crystallization, and purifications in LMNG possess both of these qualities.

## Conclusions

Detergents play a pivotal role in the solubilization, purification, and crystallization of membrane proteins. Our findings show that the relative amount and identity of contaminating proteins in purifications are strongly influenced by the detergent. Despite the use of affinity columns and SEC multiple contaminating proteins were detected and often had a similar migration pattern than the target protein making their initial detection difficult. Despite purifications starting from the same *E. coli* background, AcrB contamination was detected in all the tested maltose-based detergents, but not in FC12 or LDAO. Similarly, OmpF contamination was detected in FC12 but not in the maltosides-based detergents or LDAO. Both proteins have been repeatedly crystallized by accident highlighting the difficulty in their detection and removal throughout the purification protocols. Finally, the new detergent LMNG produced a highly pure protein that contained only AcrB as a contaminant. This stresses the usefulness of strains lacking AcrB or OmpF (or both) for overexpression of any membrane protein in *E. coli* whenever possible, or the optimization of the purification to get rid of these two nasty contaminants. Combining the strategies outlined here with recently developed FSEC or MC-SEC methods [14–16] could create a powerful platform for detecting and eliminating trace contaminants as well as assessing the stability, homogeneity, and stoichiometry in a fast and cost effective way for selecting only membrane protein samples of the highest quality possible to begin crystallization trials with.

## Supporting Information

S1 Figure. Stability of BmrA in DDM (A) versus LMNG (B). Day 0 represents the initial SEC traces after the nickel elution (left Y-axis, blue traces). For days 3 and 6 the peak from day 0 corresponding to the BmrA dimer was pooled and concentrated to 10 mg/mL and incubated at room temperature to simulate crystallization conditions and re-injected after 3 days (DDM) and 6 days (LMNG) into SEC to monitor aggregation in the two detergents (right Y-axis, green traces). Please note that panels A and B were obtained using two different SEC columns: Superdex 200 10/300 (in A) and Superdex 75 10/300 (in B).

[doi:10.1371/journal.pone.0114864.s001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114864.s001) (PDF)

S1 Table. Data collection and refinement statistics. Values in parenthesis are for the highest resolution shell.  $R_{\text{merge}} = \sum S_{\text{hkl}} S(I_i, I.) / \sum S_{\text{hkl}} S I_i$ , where  $I_i$  is the  $i$ th reflection hkl and  $I.$  is its mean intensity.

[doi:10.1371/journal.pone.0114864.s002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114864.s002) (DOCX)

S2 Table. Identification of the proteins present in the crystals loaded on SDS-PAGE. Identification of the band migrating to  $\sim 70$  kDa by mass spectrometry reveals mainly the presence of OmpF in the crystals.

[doi:10.1371/journal.pone.0114864.s003](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114864.s003) (DOCX)

## Acknowledgments

We thank the Partnership for Structural Biology, Grenoble, and the SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8) for the use of the HTX and the Mass Spectrometry platform CCMP, respectively. The technical expertise of Isabelle Zanella-Cleon from the CCMP platform is acknowledged. We also thank the staff of ESRF and SOLEIL beamlines for their helpful support during the course of this study. We are grateful to Pr. Hiroyasu Yamanaka for providing us the BL21(DE3) DacAB, DacEF mutant strain.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BW AK VC PF MJ. Performed the experiments: BW AK VC GCRM JS. Analyzed the data: BW AK VC PF MJ. Wrote the paper: BW AK VC PF MJ.

## References

- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5: 993–996.
- Stevens RC, Cherezov V, Katritch V, Abagyan R, Kuhn P, et al. (2013) The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nat Rev Drug Discov* 12: 25–34.
- Bill RM, Henderson PJ, Iwata S, Kunji ER, Michel H, et al. (2011) Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nat Biotechnol* 29: 335–340.
- Raman P, Cherezov V, Caffrey M (2006) The Membrane Protein Data Bank. *Cell Mol Life Sci* 63: 36–51.
- Kang HJ, Lee C, Drew D (2013) Breaking the barriers in membrane protein crystallography. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 636–644.
- Glover CA, Postis VL, Charalambous K, Tzokov SB, Booth WJ, et al. (2011) AcrB contamination in 2-D crystallization of membrane proteins: lessons from a sodium channel and a putative monovalent cation/proton antiporter. *J Struct Biol* 176: 419–424.
- Psakis G, Polaczek J, Essen LO (2009) AcrB et al.: Obstinate contaminants in a picogram scale. One more bottleneck in the membrane protein structure pipeline. *J Struct Biol* 166: 107–111.
- Panwar P, Deniaud A, Pebay-Peyroula E (2012) Contamination from an affinity column: an encounter with a new villain in the world of membrane-protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68: 1272–1277.

9. Veessler D, Blangy S, Cambillau C, Sciara G (2008) There is a baby in the bath water: AcrB contamination is a major problem in membrane-protein crystallization. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64: 880–885.
10. Kefala G, Ahn C, Krupa M, Esquivies L, Maslennikov I, et al. (2010) Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12. *Protein Sci* 19: 1117–1125.
11. Camara-Artigas A, Hirasawa M, Knaff DB, Wang M, Allen JP (2006) Crystallization and structural analysis of GADPH from *Spinacia oleracea* in a new form. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62: 1087–1092.
12. Morales R, Berna A, Carpentier P, Contreras-Martel C, Renault F, et al. (2006) Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein. *Structure* 14: 601–609.
13. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1: 2856–2860.
14. Drew D, Newstead S, Sonoda Y, Kim H, von Heijne G, et al. (2008) GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Protoc* 3: 784–798.
15. Kawate T, Gouaux E (2006) Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure* 14: 673–681.
16. Parcej D, Guntrum R, Schmidt S, Hinz A, Tampe R (2013) Multicolour fluorescence-detection size-exclusion chromatography for structural genomics of membrane multiprotein complexes. *PLoS One* 8: e67112.
17. Hattori M, Hibbs RE, Gouaux E (2012) A fluorescence-detection size-exclusion chromatography-based thermostability assay for membrane protein precrystallization screening. *Structure* 20: 1293–1299.
18. Kos V, Ford RC (2009) The ATP-binding cassette family: a structural perspective. *Cell Mol Life Sci* 66: 3111–3126.
19. Rees DC, Johnson E, Lewinson O (2009) ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 218–227.
20. Dawson RJ, Locher KP (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443: 180–185.
21. Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, Chang G (2007) Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19005–19010.
22. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, et al. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323: 1718–1722.
23. Jin MS, Oldham ML, Zhang Q, Chen J (2012) Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*.
24. Hohl M, Briand C, Grutter MG, Seeger MA (2012) Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. *Nat Struct Mol Biol*.
25. Steinfels E, Orelle C, Dalmas O, Penin F, Miroux B, et al. (2002) Highly efficient over-production in *E. coli* of YvcC, a multidrug-like ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* 1565: 1–5.
26. Steinfels E, Orelle C, Fantino JR, Dalmas O, Rigaud JL, et al. (2004) Characterization of YvcC (BmrA), a Multidrug ABC Transporter Constitutively Expressed in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 43: 7491–7502.
27. Dimasi N, Flot D, Dupeux F, Marquez JA (2007) Expression, crystallization and X-ray data collection from microcrystals of the extracellular domain of the human inhibitory receptor expressed on myeloid cells IREM-1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63: 204–208.
28. Battye TG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR, Leslie AG (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67: 271–281.
29. Evans PR (2011) An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67: 282–292.

30. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40: 658–674.
31. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Echols N, et al. (2011) The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods* 55: 94–106.
32. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, et al. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68: 352–367.
33. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 486–501.
34. Orelle C, Dalmas O, Gros P, Di Pietro A, Jault JM (2003) The Conserved Glutamate Residue Adjacent to the Walker-B Motif Is the Catalytic Base for ATP Hydrolysis in the ATP-binding Cassette Transporter BmrA. *J Biol Chem* 278: 47002–47008.
35. Orelle C, Gubellini F, Durand A, Marco S, Levy D, et al. (2008) Conformational change induced by ATP binding in the multidrug ATP-binding cassette transporter BmrA. *Biochemistry* 47: 2404–2412.
36. Mehmood S, Domene C, Forest E, Jault JM (2012) Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10832–10836.
37. Arachea BT, Sun Z, Potente N, Malik R, Isailovic D, et al. (2012) Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins. *Protein Expr Purif* 86: 12–20.
38. Infed N, Hanekop N, Driessen AJ, Smits SH, Schmitt L (2011) Influence of detergents on the activity of the ABC transporter LmrA. *Biochim Biophys Acta* 1808: 2313–2321.
39. Galian C, Manon F, Dezi M, Torres C, Ebel C, et al. (2011) Optimized purification of a heterodimeric ABC transporter in a highly stable form amenable to 2-D crystallization. *PLoS One* 6: e19677.
40. McDevitt CA, Collins RF, Conway M, Modok S, Storm J, et al. (2006) Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* 14: 1623–1632.
41. Ellinger P, Kluth M, Stindt J, Smits SH, Schmitt L (2013) Detergent screening and purification of the human liver ABC transporters BSEP (ABCB11) and MDR3 (ABCB4) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *PLoS One* 8: e60620.
42. Pollock NL, McDevitt CA, Collins R, Niesten PH, Prince S, et al. (2014) Improving the stability and function of purified ABCB1 and ABCA4: the influence of membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* 1838: 134–147.
43. Ravaud S, Do Cao MA, Jidenko M, Ebel C, Le Maire M, et al. (2006) The ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis* is a functional dimer when in a detergent-solubilized state. *Biochem J* 395: 345–353.
44. Boncoeur E, Durmort C, Bernay B, Ebel C, Di Guilmi AM, et al. (2012) PatA and PatB form a functional heterodimeric ABC multidrug efflux transporter responsible for the resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones. *Biochemistry* 51: 7755–7765.
45. Strop P, Brunger AT (2005) Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins. *Protein Sci* 14: 2207–2211.
46. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37: 239–253.
47. Abramson J, Riistama S, Larsson G, Jasaitis A, Svensson-Ek M, et al. (2000) The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nat Struct Biol* 7: 910–917.
48. Seeger MA, Schiefner A, Eicher T, Verrey F, Diederichs K, et al. (2006) Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* 313: 1295–1298.
49. Yamanaka H, Kobayashi H, Takahashi E, Okamoto K (2008) MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* 190: 7693–7698.
50. Caylor CL, Dobrianov I, Lemay SG, Kimmer C, Kriminski S, et al. (1999) Macromolecular impurities and disorder in protein crystals. *Proteins* 36: 270–281.
51. Lohkamp B, Dobritzsch D (2008) A mixture of fortunes: the curious determination of the structure of *Escherichia coli* BL21 Gab protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64: 407–415.

52. Chae PS, Rasmussen SG, Rana RR, Gotfryd K, Chandra R, et al. (2010) Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods* 7: 1003–1008.
53. Chung KY, Kim TH, Manglik A, Alvares R, Kobilka BK, et al. (2012) Role of detergents in conformational exchange of a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 287: 36305–36311.



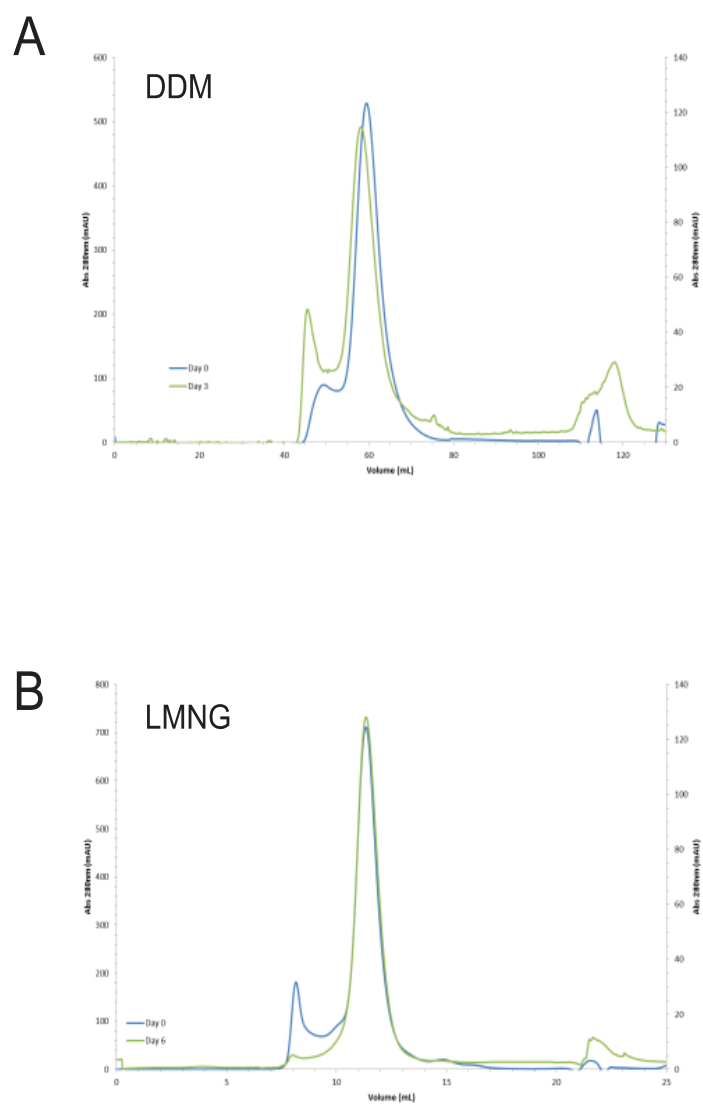


Figure S1.

PDB code	<b>4JFB</b>
Space group	<i>C</i> 2
Unit cell parameters (Å)	a=161.9, b=110.9, c=226.1, β=104.5°
Solvent content /ASU (%)	71.3
Resolution (Å)	89-3.8 (3.97-3.8)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	13.6 (49.9)
I/σ	4.3 (1.6)
Completeness (%)	96.9 (96.7)
Multiplicity	2.8 (2.8)
Refinement	
Nº. of reflections	32027
Nº. of residues	2040
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	26.2 / 31.4
Rmsd Bond Length (Å)	0.006
Rmsd Bond Angles (°)	1.097

**Table S1.**

Score	# of Peptides	Coverage (%)	MW (kDa)	Accession #	Description
20121	1125	89,50	39,3	P02931	<b>Outer membrane protein F</b>
133	5	18,27	43,3	A7ZSL4	Elongation factor Tu 1
105	3	2,21	64,5	006967	BmrA

**Table S2.**

## b) Discussion

Notre étude met en évidence que le choix du détergent est crucial dans la purification et la cristallisation des protéines membranaires. La purification parfaite d'une protéine est impossible, il y est toujours associé des quantités plus ou moins importantes d'autres protéines. Mais dans le cas des protéines membranaires la présence de certains contaminants est directement liée au détergent qui est utilisé. La porine OmpF est ainsi détectée spécifiquement dans les échantillons de BmrA purifiés en foscholine 12 alors qu'AcrB est présent avec tous les détergents maltosides. OmpF possède un profil de migration sur gel SDS-PAGE identique à celui de BmrA, ce qui rendait son identification très difficile et a conduit à sa cristallisation.

Sélectionner un détergent n'est donc pas une étape triviale et notre expérience démontre qu'il est nécessaire d'y consacrer beaucoup de temps, sous peine de résoudre une structure non désirée. Plusieurs méthodes de caractérisation, comme la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, permettent d'analyser les contaminants protéiques d'un échantillon purifié. Mais dans le cas d'AcrB, des quantités de l'ordre du picogramme suffisent pour cristalliser la protéine, ce qui rend impossible sa détection par les méthodes classiques d'identification.

OmpF et AcrB constituent aujourd'hui des contaminants très redoutés par les cristallographes de protéines membranaires. Les cas de cristallisation accidentelle concernant ces deux protéines (Kefala et *al.*, 2010; Psakis et *al.*, 2009; Veesler et *al.*, 2008) se multiplient et tous ne sont pas vantés dans une publication. En optimisant les conditions de solubilisation et de purification, nous apportons pour la première fois des solutions pour s'en débarrasser. Utiliser des souches d'*Escherichia coli* délétées dans leur génome des gènes codant pour AcrB et OmpF reste la solution la plus sûre et efficace pour les éliminer étant donné leur tendance naturelle à cristalliser, même à l'état de trace.

Pour la suite de nos recherches, les échantillons purifiés en DDM et LMNG nous ont paru particulièrement intéressants puisque dans les deux cas BmrA est élué sur colonne de gel filtration en un pic parfaitement symétrique, signe d'une population homogène et monodisperse. Dans le cas du LMNG, AcrB est le seul contaminant identifié, ce qui signifie que l'utilisation d'une souche d'*E.coli*  $\Delta$ acrB permettrait d'obtenir un degré de pureté proche de 100%. Ce détergent de type maltose-neopentyl glycol possède un carbone quaternaire central qui permet de relier une tête hydrophile contenant deux groupements maltoside à deux chaînes hydrophobes. Le LMNG a montré une meilleure capacité à stabiliser et maintenir en solution BmrA comparativement à certains détergents classiques comme le DDM. D'autre part, il a été utilisé avec succès pour résoudre la structure cristallographique du récepteur adrénergique humain  $\beta_2$ -T4-lysozyme (Rasmussen et *al.*, 2011).

## Cristallisation d'OmpF dans deux formes cristallines différentes

**Manuscrit 1:** “Two different centered monoclinic crystals of the *E. coli* outer-membrane protein OmpF originate from the same building block”, soumis dans le journal BMC Structural Biology.

### a) Résumé des principaux résultats

Comme nous l'avons vu précédemment, OmpF a été cristallisé comme contaminant dans la purification de BmrA en foscholine 12. L'optimisation des cristaux d'OmpF nous a permis de collecter de façon concomitante des données de diffraction jusqu'à 3,8 et 3,5 Å de résolution pour deux formes cristallines distinctes. La première a été obtenue dans la condition: 18% PEG 1500, 10% MPD (reportée dans Wiseman, Kilburg et *al.*) et la seconde cristallise dans la condition : 16% PEG 4000, 0,4 M NaCl, 10 mM de chlorure de cadmium (utilisé comme additif) à 19°C. Ces deux formes appartiennent respectivement aux groupes d'espace monoclinique centré C2 et I2 qui n'ont tous deux jamais été observés auparavant dans les structures d'OmpF déjà déposées dans la PDB. Les deux structures sont identiques avec un RMSD de 0,5 Å sur les 1020 résidus d'OmpF. Dans les deux cas, le réseau cristallin s'organise sous la forme de colonnes avec les trimères d'OmpF qui s'empilent les uns aux dessus des autres le long de l'axe c. Deux trimères s'associent au niveau de la région extracellulaire d'OmpF (appelée rough side) et cet assemblage est ensuite répété via la partie périplasmique de la protéine (appelée smooth side).

#### (1) Deux structures cristallographiques d'OmpF, avec et sans tNCS

Malgré des paramètres de maille très similaires, l'empilement cristallin (ou packing) de ces deux formes est différent et conduit à une symétrie non-cristallographique translationnelle (tNCS) pour la forme diffractant à 3,8 Å. Dans le cristal I2 (sans tNCS), l'unité asymétrique est composée de deux trimères, orientés dans deux directions opposées qui s'associent via le côté périplasmique d'OmpF. Dans l'unité asymétrique du cristal C2 (avec tNCS), les deux trimères pointent au contraire dans la même direction et sont reliés par un vecteur de translation défini par la carte des Patterson. La comparaison des unités asymétriques des deux structures montrent que les trimères interagissant au niveau de la partie extracellulaire d'OmpF se superposent parfaitement et constituent la structure de base des deux réseaux (building block). La différence de packing se situe au niveau de l'interaction périplasmique des trimères d'OmpF qui sont reliés par une rotation de 178.4° entre les deux cristaux.

#### (2) Les conditions de cristallisation et le détergent influencent l'empilement cristallin d'OmpF

Les conditions de cristallisation jouent un rôle déterminant dans l'empilement cristallin d'OmpF et ont conduit dans un cas à la formation d'une symétrie non cristallographique translationnelle. Celle-ci est rendue possible par la ceinture de détergent autour d'OmpF qui empêche les contacts latéraux protéine-protéine (le long des axes a et b) et favorise ainsi la mobilité et les changements d'orientation du trimère. Les molécules de déter-

gent interagissent entre elles mais ne sont pas suffisamment ordonnées pour être visibles en cristallographie aux rayons X. Ces résultats rejoignent ceux d'une étude publiée en 1986 par Garavito et *al* qui montre que le changement de forme cristalline est influencé par les conditions de cristallisation et l'organisation des molécules de détergent autour de la protéine. Le ratio protéine/détergent influence ainsi directement la croissance cristalline (Pebay-Peyroula et *al.*, 1995).



## PUBLICATION 2

# TWO DIFFERENT CENTERED MONOCLINIC CRYSTALS OF THE *E. COLI* OUTER- MEMBRANE PROTEIN OMPF ORIGINATE FROM THE SAME BUILDING BLOCK

Vincent Chaptal, **Arnaud Kilburg**, David Flot, Benjamin Wiseman,  
Nushin Aghajari, Jean-Michel Jault et Pierre Falson

Soumis dans le journal BMC Structural Biology

# TWO DIFFERENT CENTERED MONOCLINIC CRYSTALS OF THE *E. COLI* OUTER-MEMBRANE PROTEIN OMPF ORIGINATE FROM THE SAME BUILDING BLOCK

---

## Authors

Vincent Chaptal<sup>1</sup>, **Arnaud Kilburg**<sup>1</sup>, David Flot<sup>2</sup>, Benjamin Wiseman<sup>3</sup>, Nushin Ag-hajari<sup>4</sup>, Jean-Michel Jault<sup>3, 5</sup> and Pierre Falson<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Drug Resistance Mechanism and Modulation team, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, 7 passage du Vercors, F-69367, Lyon, France.

<sup>2</sup>ESRF -The European Synchrotron 71, Avenue des Martyrs Grenoble, France.

<sup>3</sup>Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), 6 rue Jules Horowitz, Grenoble, F-38027 cedex-1, France ; CEA, DSV, IBS, F-38000, Grenoble, France; CNRS UMR 5075, F-38000 Grenoble.

<sup>4</sup>Biocrystallography and Structural Biology of Therapeutics Targets team, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, 7 passage du Vercors, F-69367, Lyon, France.

<sup>5</sup>Present address: Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), UMR5086 CNRS/Université Lyon 1, 7 passage du Vercors, F-69367, Lyon, France.

**Corresponding author:** Vincent Chaptal, Drug Resistance Mechanism and Modulation team, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), UMR5086 CNRS/Université Lyon 1, 7 passage du Vercors, F-69367, Lyon, France. Tel: +33437652901, Fax: +33472722601. Email: vincent.chaptal@ibcp.fr

**Running title** : OmpF centered-monoclinic crystals formation

**Abstract** Macromolecule crystal formation can be divided in two major steps, with first the formation of a nucleus and second the growth of this nucleus into a full mature crystal. The latter is well described and understood, while the former remains elusive owing to the difficulty to study it and is described by nucleation theories. Here we report the structure of the *E. coli* outer membrane porin OmpF in two centered monoclinic space groups. Strikingly, the two crystals originate from the same building block, made of two trimers of OmpF interacting via their rough side. The different crystallization conditions trigger the formation of distinct arrangement of these building blocks, leading to the formation of translational Non-Crystallographic Symmetry (tNCS) in one case, made possible by the loose lateral packing mediated by detergents.

In light of nucleation theories, these results allow us to speculate that these two crystals originate from nuclei made of either clusters of building blocks, or already forming columns that later associate laterally using detergents as glue.

**Keywords**: OmpF; detergent belt; porin; centered monoclinic lattice; tNCS; Translational Non-Crystallographic Symmetry

## **Introduction:**

Obtaining 3D crystals from membrane proteins is a major bottleneck for their structural studies, often referred to as searching for a needle in a haystack. It is well documented that crystals grow in the metastable zone of a phase diagram, after formation of initial nuclei that serve as scaffold for the growth of the macroscopic crystals [1, 2]. The formation of the nucleus itself however remains elusive, and overall no one can predict when and how a crystal is going to form. Rather, investigators rely on guidelines to streamline the process, with the gold standard being a homogenous protein population on size exclusion chromatography, and screen numerous conditions to find initial hits and optimize them [3].

Following this procedure with the aim of crystallizing an ABC multidrug transporter, BmrA [4], initial crystallization hits were optimized using typical ligands of ABC transporters, and resulted in the formation of two distinct crystals. It was in fact the crystallization of a contaminant from the purification process, the *E. coli* outer-membrane protein OmpF, because the detergent used for purification, Fos-Choline 12, co-extracts OmpF and allowed its co-purification with BmrA. A similar accident happened to Kefala *et al* upon purification of the *E. coli* histidine kinase receptor KdpD [5], and strategies to avoid such contamination in the future are detailed in [6]. Despite this accidental event, interesting information on crystal formation originates from the comparison of these two distinct crystals.

Here we report the structure of OmpF in the new centered monoclinic space group I2, while the other crystal (centered monoclinic, C2) has been reported in [6]. This work is the first critical analysis of these two crystal forms leading to the conclusion that they originate from the same building block, which arrange differently due to loose lateral packing mediated by detergent molecules. This remarkable crystal packing induced (in one of the two crystal forms) translational Non-Crystallographic Symmetry, a crystalline pathology often hindering structure determination. These data bring a unique view on membrane-protein crystal formation.

## **Results/Discussion:**

### **Two different crystals originate from the same building block:**

The protein OmpF from the outer-membrane of *E. coli* crystallized in place of the multidrug-resistance protein BmrA from *B. subtilis*, in a new centered monoclinic system (I2) never reported so far for this protein. The crystal packing is noticeable, showing columns of OmpF trimers stacked along the c axis with two trimers associated *via* rough sides interactions, and repeating this assembly by assembling *via* their smooth sides to another association of OmpF trimers (Figure 1). In this regard, this packing is different from the one observed previously in space groups P321 or P6<sub>3</sub> [5, 7-13] where trimers of OmpF pack in the same direction, with the rough side pointing to the neighboring smooth side, creating directional columns.

Interestingly, OmpF crystallized in another centered monoclinic system (C2) [6] and displayed an extremely close crystal packing, yet with very distinct crystallization conditions (Figure 1). First, it is important to note that no significant difference in the structure of the OmpF monomer or trimer was observed between the two centered monoclinic systems, as the rmsd is less than 0.5 Å over the 340 residues of any monomer, or over the 1020 residues of the whole trimer. Also, comparison with all the structures of OmpF deposited within the protein data bank, yielded an overall displacement of the trimers of less than 1 Å, that is linked to the fact that OmpF is a very solid and stable protein, capable of withstanding 5 M guanidinium hydrochloride or heating at 70°C in 2% SDS [14]. OmpF is indeed exposed to the outside environment and to harsh living conditions, requiring a sturdy protein. Thus, the differences between these two systems (I2 vs C2) are at the crystal packing level and in the arrangement of OmpF trimers. Superposition of the asymmetric units reveals that when the C2 cell (displayed in black) is overlaid on the I2 cell on the trimer DEF, the trimers opposite the rough side match perfectly (Figure 2). On the contrary, when the overlay is carried out on trimer ABC, the trimers interacting *via* their smooth side are arranged completely differently. This means that on the two cells, the interaction *via* the rough side is kept identical, and the difference in the crystal packing comes from a different interaction on the smooth side of OmpF. The smaller loops of the smooth (periplasmic) side permit several crystallographic interactions, and this promiscuity of non-physiological interactions might be reminiscent of the ability to interact physiologically with several partners in the periplasm, including chaperones [15] and proteins of the Tol family [16]. The two trimers interacting *via* their rough sides are thus the building blocks on which the two crystals originate.

#### How can the same building blocks trigger, in only one case, the formation of a crystalline 'pathology'?

Analysis of the intensities statistics using the program "*phenix.xtriage*" [17] revealed an off-origin peak in the Patterson function (STable 1) synonym of translational Non-Crystallographic Symmetry (tNCS) (Figure 1), for the crystal in space group C2 [6] and not for the one in I2. The presence of the crystalline 'pathology' tNCS, which results in ambiguity on space group determination and thus on structure determination, indicates that the asymmetric unit of the C2 crystal is composed of two trimers of OmpF pointing in the same direction and linked by the translation vector defined using the Patterson map. For the I2 crystal of OmpF (without tNCS), the asymmetric unit is composed of two trimers associated *via* their smooth sides. Superposition of the two cells shows that the OmpF trimers originating from crystal symmetry (C2 with tNCS in green) or forming the asymmetric unit (I2 in blue) are linked by a 178.4° rotation (Figure 3). Overall, the two cells share the same content, made of stacks of OmpF trimers, but arranged in a slightly different way.

The explanation to what is triggering such a change of crystal packing lies in early experiments on OmpF crystallization by Garavito and Rosenbusch who witnessed that the change in PEG and ionic strength plays an important role in determining the crystal form



[18]. More specifically, they observed that the addition of organic solvent biases crystallization towards the generation of the centered monoclinic form. Similarly, Pebay-Peyroula *et al* investigated the change from the tetragonal to trigonal crystal forms linked to crystallization conditions and the way detergents molecules are involved in the crystalline network [19]. In fact, the two crystal forms reported here differ in the crystallization conditions, using different PEGs, salts and organic solvents. The use of one crystallization condition favored a specific crystal packing over the other, resulting in the creation of tNCS. The apparition of this phenomenon is made possible by the loose lateral packing mediated by detergents (see below).

#### Detergents are involved in lateral packing:

A striking observation in the crystal packing of these two centered monoclinic crystal forms of OmpF is the lack of lateral protein:protein contacts (Figure 4). Of all the OmpF structures available in the PDB, those crystallized in detergents in space groups P321 or P6<sub>3</sub> [5, 7-13] also crystallize as OmpF columns, but stacking directional with the rough side facing the smooth side of another monomer. They either have contacts *via* their hydrophobic regions, or make crystal contact *via* the loops to the other column thereby having classic type II crystalline interactions. For OmpF crystallized *in-meso* and displaying type I packing [20], there are lateral interactions involving lipids together with protein:protein interactions between the 2D layers of the crystal. On the contrary, here OmpF stacks as columns along the c axis and no protein:protein contacts are detected along a and b axes. But this apparent void is in fact full of solvent, amongst which detergents are key players. Indeed, membrane proteins purified in detergents are surrounded by a detergent belt, as was exemplified by neutron diffraction on OmpF crystals themselves [19, 21]. Therefore, the chances are high that the lateral packing interactions are given by detergent molecules, which are not sufficiently ordered to be visible in X-ray diffraction. They contribute to the crystal packing without strict lateral constraints and, therefore, permit a relative change in orientation of the OmpF trimer.

#### Concluding remarks:

Nucleation of macromolecule crystals is largely unknown, and relies on knowledge based on nucleation studies of small molecule. The classical nucleation theory, the simplest and most widely used, defines the free energy of the system as the contribution of the two opposite free energies from the phase transformation (formation of a nucleus, negative) and from the formation of a surface (positive). While this theory simplifies the description of the nucleation process, it does not apply to all cases and in particular does not take into account local concentrations within the droplets. Based on this, the two-step nucleation model has been implemented, assuming first the formation of a dense phase of clusters, followed by their organization into structured clusters [1, 2]. For membrane proteins, crystal nucleation

is even less understood because the involvement of detergents in crystal contacts complexifies the system and is still largely unknown.

Here, we provide a unique insight into crystal formation and on the implication of detergents in the process. We witness the creation of two different crystals from the same building block of OmpF trimers. The macroscopic change of packing is the result of distinct crystallization conditions, permitted by the loose lateral packing mediated by detergent molecules surrounding the membrane protein. In the light of nucleation theories, we speculate that the crystals originate from trimers of OmpF interacting *via* their rough sides, either forming as such clusters of building blocks, or already starting to form columns that later associate laterally using detergent as “glue”. Solution studies such as light scattering or ultracentrifugation would be useful to identify the presence of either type of clusters and to discriminate between these hypotheses, assuming that the signal given by the minute amounts of contaminating OmpF in solution can be extracted from the one of the originally purified protein.

## **Materials and methods:**

### Protein purification and crystallization

BmrA was purified as described in Wiseman *et al* [6], using the detergent Fos-Choline 12 (FC12, Anatrace). BmrA was concentrated to 10 mg/ml and incubated with 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>-VO<sub>4</sub> and 5 mM Daunorubicin (Sigma) for 30 minutes on ice and mixed in a 1:1 ratio with a reservoir solution containing 16% PEG 4000, 0.4 M NaCl and 10 mM CdCl<sub>2</sub> as an additive, at 19°C. Crystallization was performed with a Mosquito workstation (TTP labtech) to set-up hanging drops over 96 well plates, using the vapor diffusion technique. Large crystals were harvested, cryo-protected by a quick dip in a solution containing the well solution supplemented by 10% glycerol, and flash cooled in liquid nitrogen.

### Structure determination

Data from a rod-shaped crystal shot at a single location were collected on the beamline XALOC [22] at ALBA. Data were indexed with the program “MOSFLM” as belonging to the space group C2 with the longest axis along a ( $a = 238.4 \text{ \AA}$ ,  $b = 115.7 \text{ \AA}$ ,  $c = 159.7 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 115.4^\circ$ ), then re-indexed to I2 using the program “Pointless” in order to bring the longest axis along c, following international conventions (STable 1). The two crystal systems are different but equivalent centered monoclinic systems, and describe identically the reciprocal space. No off-origin peak in the native Patterson map was detected, indicating the absence of tNCS, contrary to the crystals described in [6]. Phases were obtained by molecular replacement using the program “Phaser” [23] and a trimer of OmpF as a search model (PDB: 2ZFG). The structure was refined using “phenix.refine” [24] employing restrained refinement with group B (two groups per residue), TLS (5 TLS groups per chain) and secondary structure restraints, alternated with manual rebuilding in Coot [25]. Non-crystallographic symmetry was used throughout the refinement. Coordinates have been deposited under accession code 4d5u.

**Competing interests:**

The authors declare no conflict of interest

**Acknowledgements:**

This work was supported by the ANR grant EMMA-10-049-01, 13-BSV5-0001-01 and the “labellisation par la Ligue Nationale Contre le Cancer”. The authors wish to thank Randy Read, Mike Sawaya, Michael Garavito and Patrice Gouet for useful discussions during data analysis and writing of the manuscript. We acknowledge the synchrotrons SOLEIL, ESRF and ALBA for allocation of beam time and we are thankful to the beamline staff for their support and for the extensive beam-time required for membrane-protein projects. Financial support of Arnaud Kilburg was received from the Rhône-Alpes region. The crystallization work benefited from the Protein Science Facility of the SFR Biosciences Lyon.

**References:**

1. Candoni N, Grossier R, Hammadi Z, Morin R, Veessler S: **Practical physics behind growing crystals of biological macromolecules**. *Protein and peptide letters* 2012, **19**(7):714-724.
2. Erdemir D, Lee AY, Myerson AS: **Nucleation of crystals from solution: classical and two-step models**. *Accounts of chemical research* 2009, **42**(5):621-629.
3. Newby ZE, O'Connell JD, 3rd, Gruswitz F, Hays FA, Harries WE, Harwood IM, Ho JD, Lee JK, Savage DF, Miercke LJ *et al*: **A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation**. *Nat Protoc* 2009, **4**(5):619-637.
4. Steinfels E, Orelle C, Fantino JR, Dalmas O, Rigaud JL, Denizot F, Di Pietro A, Jault JM: **Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in Bacillus subtilis**. *Biochemistry* 2004, **43**(23):7491-7502.
5. Kefala G, Ahn C, Krupa M, Esquivies L, Maslennikov I, Kwiatkowski W, Choe S: **Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12**. *Protein Sci* 2010, **19**(5):1117-1125.
6. Wiseman B, Kilburg A, Chaptal V, Reyes-Mejia GC, Sarwan J, Falson P, Jault JM: **Stubborn Contaminants: Influence of Detergents on the Purity of the Multidrug ABC Transporter BmrA**. *PLoS One* 2014, **9**(12):e114864.
7. Balasubramaniam D, Arockiasamy A, Kumar PD, Sharma A, Krishnaswamy S: **Asymmetric pore occupancy in crystal structure of OmpF porin from Salmonella typhi**. *J Struct Biol* 2012, **178**(3):233-244.
8. Reitz S, Cebi M, Reiss P, Studnik G, Linne U, Koert U, Essen LO: **On the function and structure of synthetically modified porins**. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009, **48**(26):4853-4857.
9. Yamashita E, Zhaltina MV, Zakharov SD, Sharma O, Cramer WA: **Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon**. *EMBO J* 2008, **27**(15):2171-2180.

10. Phale PS, Philippsen A, Widmer C, Phale VP, Rosenbusch JP, Schirmer T: **Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation.** *Biochemistry* 2001, **40**(21):6319-6325.
11. Phale PS, Philippsen A, Kiefhaber T, Koebnik R, Phale VP, Schirmer T, Rosenbusch JP: **Stability of trimeric OmpF porin: the contributions of the latching loop L2.** *Biochemistry* 1998, **37**(45):15663-15670.
12. Lou KL, Saint N, Prilipov A, Rummel G, Benson SA, Rosenbusch JP, Schirmer T: **Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. I. Crystallographic analysis.** *J Biol Chem* 1996, **271**(34):20669-20675.
13. Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP: **Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins.** *Nature* 1992, **358**(6389):727-733.
14. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P: **Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell.** *Mol Microbiol* 2000, **37**(2):239-253.
15. Mogensen JE, Otzen DE: **Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins.** *Mol Microbiol* 2005, **57**(2):326-346.
16. Rigal A, Bouveret E, Lloubes R, Lazdunski C, Benedetti H: **The TolB protein interacts with the porins of Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1997, **179**(23):7274-7279.
17. Zwart PH, Grosse-Kunstleve RW, Lebedev AA, Murshudov GN, Adams PD: **Surprises and pitfalls arising from (pseudo)symmetry.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2008, **64**(Pt 1):99-107.
18. Garavito RM, Rosenbusch JP: **Isolation and crystallization of bacterial porin.** *Methods Enzymol* 1986, **125**:309-328.
19. Pebay-Peyroula E, Garavito RM, Rosenbusch JP, Zulauf M, Timmins PA: **Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin.** *Structure* 1995, **3**(10):1051-1059.
20. Efremov RG, Sazanov LA: **Structure of Escherichia coli OmpF porin from lipidic mesophase.** *J Struct Biol* 2012, **178**(3):311-318.
21. Penel S, Pebay-Peyroula E, Rosenbusch J, Rummel G, Schirmer T, Timmins PA: **Detergent binding in trigonal crystals of OmpF porin from Escherichia coli.** *Biochimie* 1998, **80**(5-6):543-551.
22. Juanhuix J, Gil-Ortiz F, Cuni G, Colldelram C, Nicolas J, Lidon J, Boter E, Ruget C, Ferrer S, Benach J: **Developments in optics and performance at BL13-XALOC, the macromolecular crystallography beamline at the ALBA synchrotron.** *Journal of synchrotron radiation* 2014, **21**(Pt 4):679-689.
23. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ: **Phaser crystallographic software.** *J Appl Crystallogr* 2007, **40**(Pt 4):658-674.

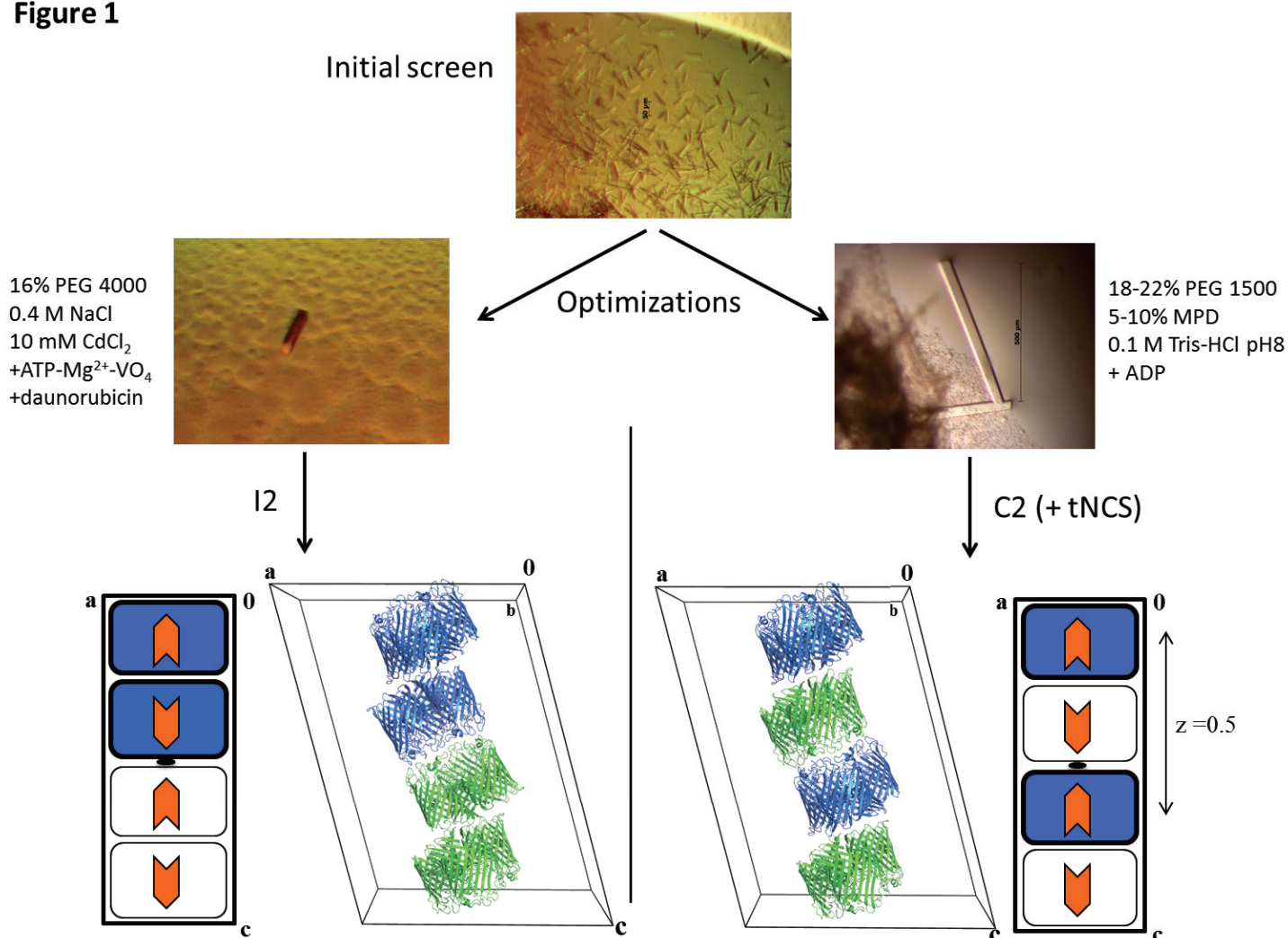
24. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD: **Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine**. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2012, **68**(Pt 4):352-367.
25. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K: **Features and development of Coot**. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, **66**(Pt 4):486-501.

**Table 1** Data collection and refinement statistics.

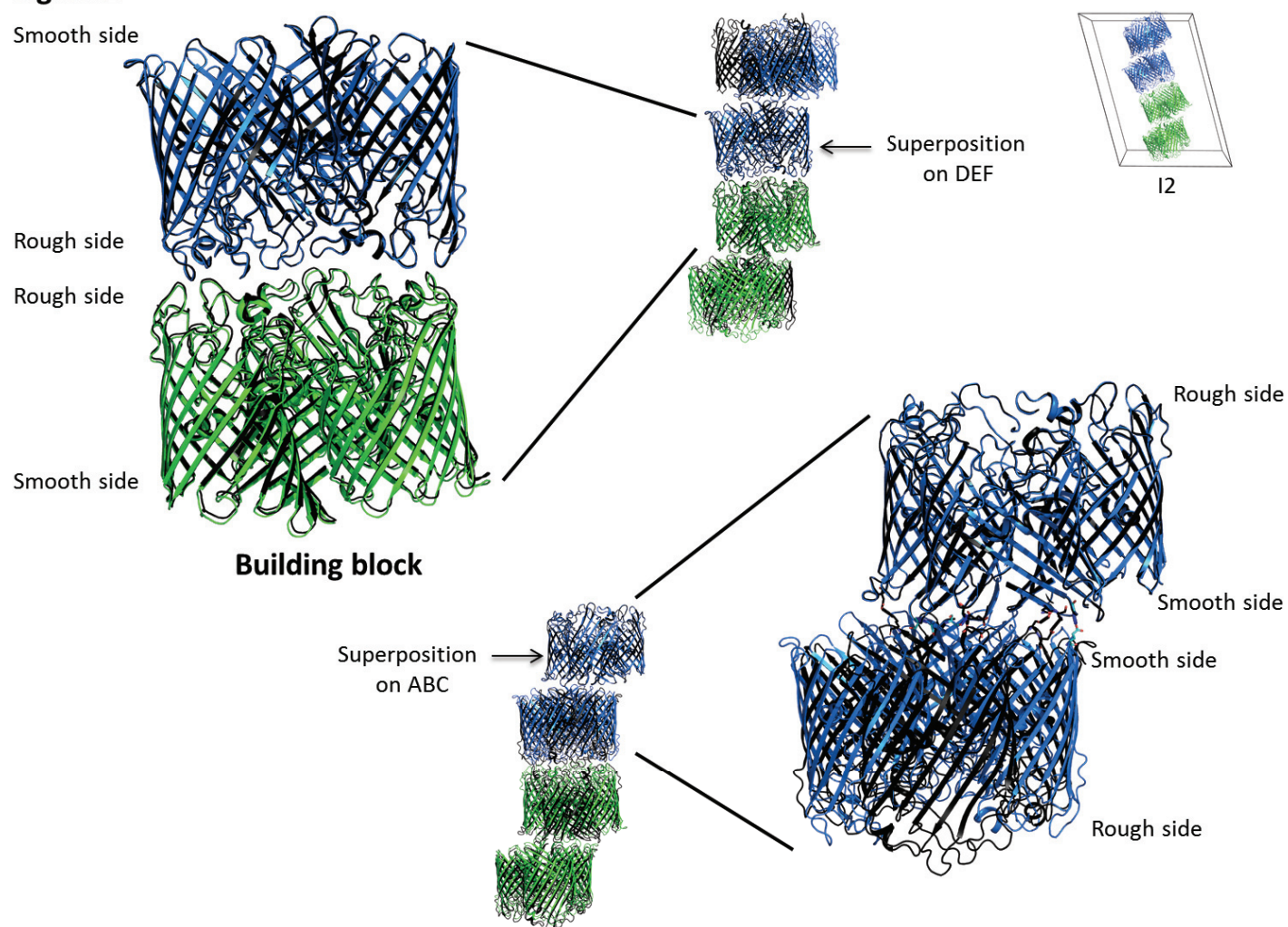
	<b>C2 with tNCS</b>	<b>I2</b>
PDB code	4jfb	4d5u
Crystallization condition	PEG 1500 / MPD	PEG 4000 / NaCl
Unit cell parameters (Å)	a=161.9, b=110.9, c=226.1, β=104.5°.	a=159.7, b=115.7, c=222.9, β=104.95°.
Solvent content /ASU (%)	71.3	71.3
Resolution (Å)	89-3.8 (3.97-3.8)	24.83-3.5 (3.61-3.5)
R <sub>merge</sub> (%)	13.6 (49.9)	16.7 (44.5)
I/σ	4.3 (1.6)	4.5 (1.8)
Completeness (%)	96.9 (96.7)	97.6 (97.9)
Multiplicity	2.8 (2.8)	2.5 (2.4)
Patterson peak position (height %)	x=-0.001, y=0.055, z=0.5 (39.8%)	-
Refinement		
No. of reflections	32027	48149
No. of atoms		15846
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	26.2 / 31.4	22.9 / 28.3
Rmsd Bond Lengths (Å)	0.006	0.009
Rmsd Bond Angles (°)	1.097	1.252

$R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i (I_i - \langle I \rangle) / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i$ , where  $I_i$  is the  $i$ th reflection  $\text{hkl}$  and  $\langle I \rangle$  is its mean intensity. Values in parenthesis are for the highest resolution shell.

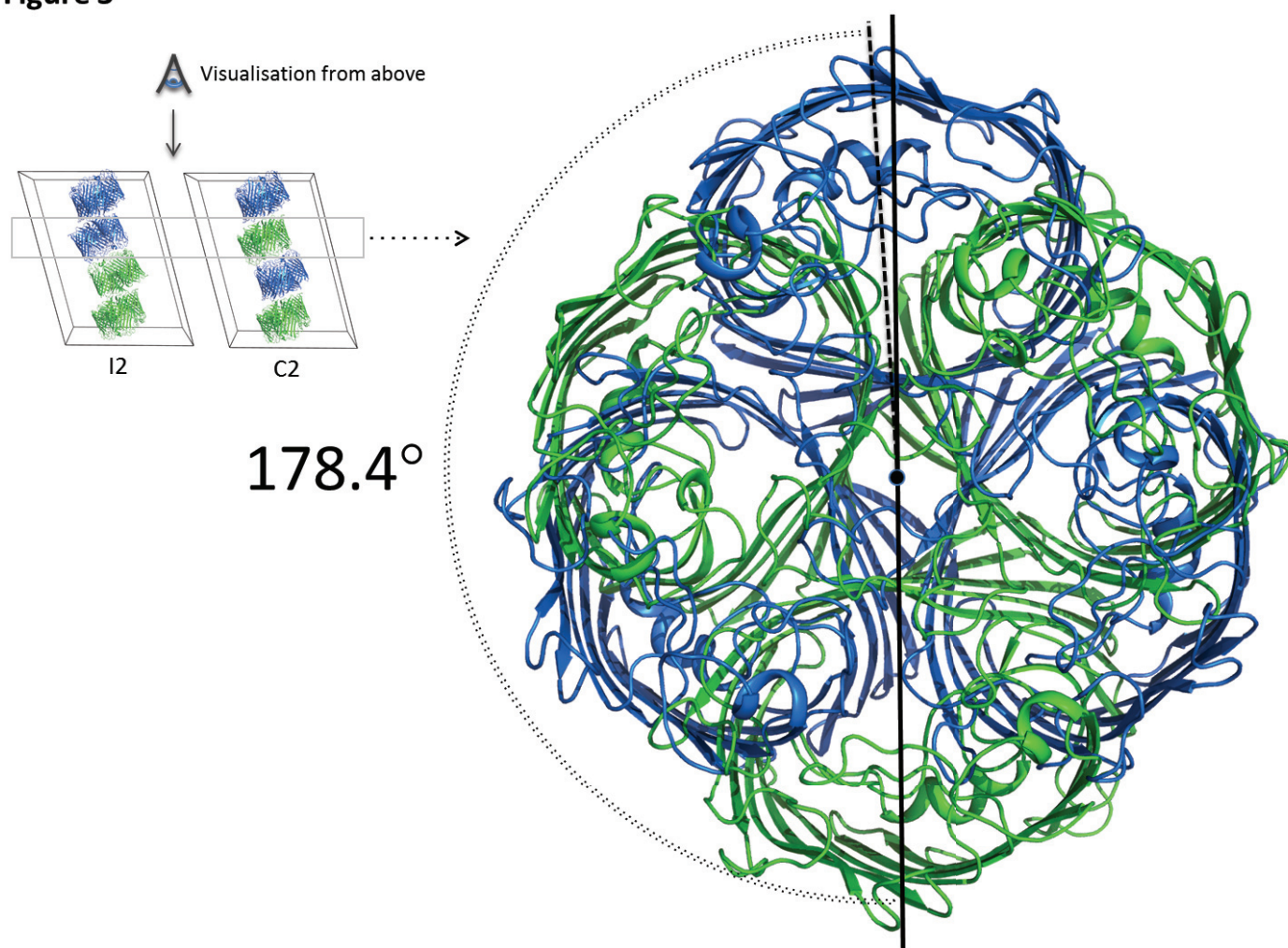


**Figure 1**

**Figure 1** Centered monoclinic cells of OmpF crystals. Optimization of initial crystals was carried out following two different routes and yielded rod-shaped crystals having similar dimensions. Structure solution revealed that one of the crystals belonged to space group I2 (this work) and the other one to C2 with tNCS [6]. OmpF trimers are shown as cartoon with the asymmetric unit colored in blue and the symmetry related molecules in green. For clarity, only one symmetric is shown; the full cell can be seen in Figure 4. The real cell is drawn in black with the origin (O) and the letters (a, b, c) symbolizing the real vectors. Schematics of the cells are drawn along the ac plane with the asymmetric unit in blue, and the orange arrows symbolizing the directionality of OmpF trimers. The arrow points from the smooth side (periplasmic) to the rough side (outside of the cell).

**Figure 2**

**Figure 2** Crystal building blocks. Overlay of the two cells on the two trimers of the asymmetric unit of the I2 cell, without tNCS (blue). The color theme has been kept as in Figure 1 except for the C2 cell with tNCS displayed in black.

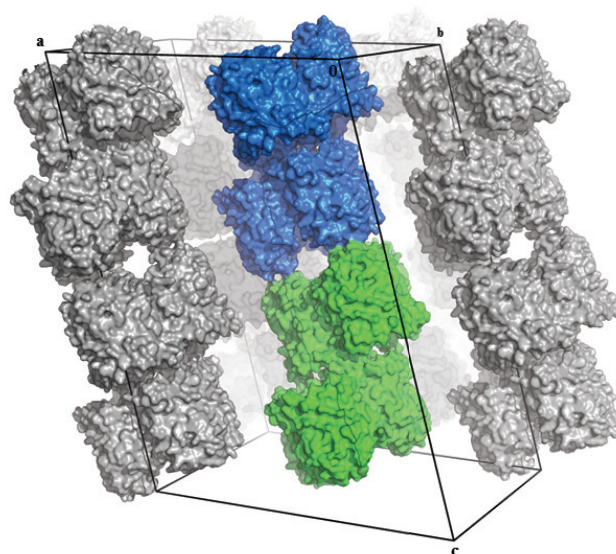
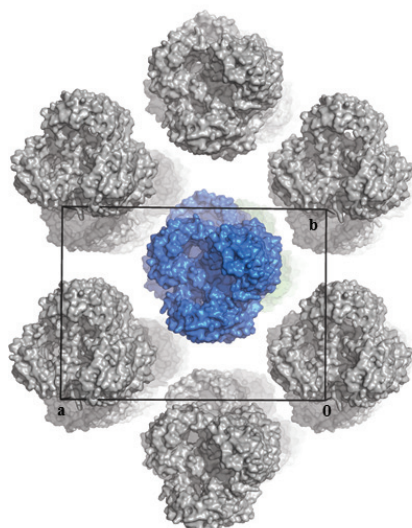
**Figure 3**

**Figure 3** Difference between the two cells at the level of the trimer part of the asymmetric unit (blue, I2) or coming from crystal symmetry (green, C2 + tNCS). The two cells were overlaid on trimer ABC using SSM. The rotation angle between the blue and green trimer is calculated by superposing these two trimers using SSM, and given by the polar coordinate  $k$ . The color theme has been kept as in Figure 1.

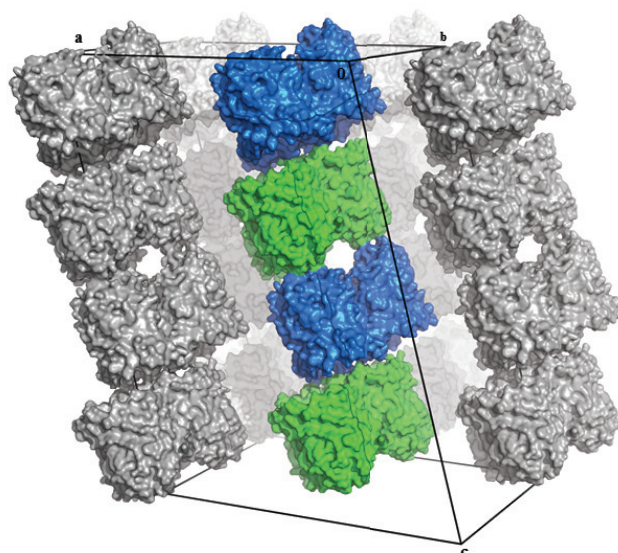
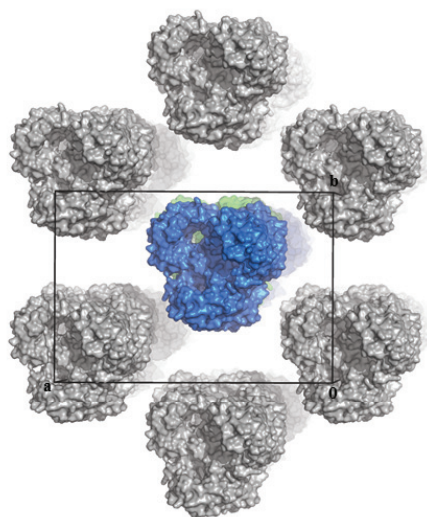


**Figure 4**

I2



C2



**Figure 4** Crystal packing of centered monoclinic OmpF crystals. The protein is shown as surface with the asymmetric unit colored in blue and one symmetry-related mate in green. The other symmetry-related trimers are displayed in grey. Two views at 90° rotation are shown to visualize the absence of lateral protein:protein contacts within the crystals.

## C. CONCLUSION

Les résultats de ces deux publications montrent à quel point le choix du détergent constitue un facteur clé pour la purification et la cristallisation des protéines membranaires. Dans le cadre de l'étude structurale de BmrA, ils montrent que le détergent idéal n'existe pas. Les détergents zwitterioniques (foscholine 12 ou 16) et maltosides présentent en effet l'inconvénient de co-purifier respectivement OmpF et AcrB, deux contaminants qui ont tendance naturellement à cristalliser.

Nos résultats constituent malgré tout une avancée significative dans notre projet de déterminer la structure cristallographique du transporteur. Car nous avons pu montrer, après avoir exprimé BmrA dans une souche d'*E. coli* délétée dans son génome du gène codant pour AcrB, que la protéine purifiée en DDM ou LMNG est éluée en une population parfaitement homogène et monodisperse, qui présente un degré final de pureté proche de 100%. Fort de ce constat très encourageant, nous avons pu entreprendre de nombreux essais de cristallisation.

## II. PURIFICATION ET CRISTALLISATION DE LA PROTEINE SAUVAGE BMRA ET D'UNE FORME MUTE INACTIVE EN DDM ET LMNG

La seconde partie de l'étude structurale de BmrA a donc consisté à produire la protéine sauvage et le mutant inactif E504A de BmrA dans la souche C43(DE3) d'*Escherichia coli* délétée dans son génome du gène codant pour AcrB (C43  $\Delta$ acrB). Nous avons ensuite pu purifier sur colonne d'affinité au nickel puis par chromatographie d'exclusion-diffusion des quantités très importantes de BmrA. Les échantillons obtenus en  $\beta$ -DDM et LMNG sont compatibles avec des expériences de cristallogénèse puisque le degré final de pureté est proche de 100% et la population de protéine est parfaitement homogène. L'ensemble de ces résultats étant très encourageants, nous avons donc entrepris un large criblage des conditions de cristallisation grâce au robot de nanopipetage Mosquito dont est équipée la plateforme de cristallogénèse de l'IBCP.

L'ensemble de ce travail est présenté dans cette partie. Nous reviendrons dans un premier temps sur le protocole utilisé pour exprimer, purifier et cristalliser BmrA en  $\beta$ -DDM et LMNG. Puis dans un deuxième temps, nous détaillerons les résultats qui ont été obtenus, aborderons les difficultés rencontrées et enfin nous discuterons des pistes qu'il nous reste encore à explorer pour parvenir à cristalliser BmrA.

### A. **MATERIEL ET METHODES**

#### **Produits chimiques**

Les bactéries ont été cultivées dans un milieu de culture LB broth (Sigma Aldrich). Celui-ci contient 10 g de bactotryptone, 5 g d'extraits de levure et 10 g de NaCl par litre.

Pour la purification en DDM, le n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranoside Sol-Grade (qui contient moins de 5% d'anomères  $\alpha$ ) (Anatrace) a été utilisé pour les étapes de solubilisation et de chromatographie d'affinité. Le n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranoside Anagrade (plus pur que le précédent avec seulement 2% d'anomères  $\alpha$ ) (Anatrace) a été utilisé pour la chromatographie d'exclusion diffusion.

Pour la purification en LMNG, le Lauryl Maltose Neopentyl Glycol utilisé provient de chez Anatrace.

#### **Le matériel biologique**

En parallèle de BmrA sauvage, nous avons utilisé le mutant E504A de BmrA dont le gène a été cloné dans le plasmide pET15b (disponible au laboratoire). BmrA E504A est un mutant catalytique donc inactif. Le résidu glutamate 504, adjacent au motif B de Walker est indispensable à l'hydrolyse de l'ATP (Orelle et *al.*, 2003). Ce mutant fixe l'ATP mais ne l'hydrolyse pas. Il a été utilisé dans le but de stabiliser une conformation de BmrA, qui soit moins flexible que la protéine sauvage au moins au niveau des NBDs. Le mutant E504A de BmrA a été surproduit et purifié suivant le même protocole que la protéine sauvage.



Il n'existe pour l'heure aucune souche C41(DE3) d'*Escherichia coli* délétée dans son génome du gène codant pour AcrB. Nous avons donc utilisé la souche C43(DE3)  $\Delta$ acrB qui nous a été fournie par le Professeur Klaas Martinus Pos. Cette souche est bien adaptée à l'expression des protéines membranaires. Arechaga, Miroux et *al* ont montré par microscopie électronique que la bactérie était capable de s'adapter à la production d'une protéine membranaire, la sous-unité b de l'ATP synthase d'*E. coli*, en synthétisant davantage de lipides. Ces derniers s'organisent alors en un réseau complexe de vésicules et membranes intracellulaires (Arechaga, Miroux et *al.*, 2000).

### Surproduction de BmrA

Les bactéries ont été rendues compétentes par une perméabilisation au chlorure de calcium et ont ensuite été transformées par les plasmides pET15b-BmrA sauvage et pET15b-BmrA E504, comme décrit dans la partie matériel et méthodes de la partie précédente.

Une colonie isolée a été utilisée pour ensemercer 200 mL de milieu de culture LB autoclavé (dans un erlen de 1 L), et auquel a été ajouté de l'ampiciline à 50 µg/mL final. La préculture est ensuite incubée toute la nuit à 37°C sous agitation (190 rpm). Le lendemain matin, la densité optique se situe aux alentours de 3,5. Quatre erlens de 5 L de milieu LB ont été autoclavés la veille. On ajoute de l'ampiciline dans les quatre litres de milieu et celui-ci estensemencé avec environ 30 ml de préculture (pour avoir une DO initiale de 0,1). La culture est ensuite incubée à 23°C précisément et 190 rpm d'agitation. L'expression de BmrA est déclenchée à partir d'une DO comprise entre 0,5 et 0,6 par l'ajout d'IPTG à 0,7 mM final suivi d'une incubation à 23°C dans les mêmes conditions pendant 6 h. Les bactéries sont ensuite récoltées par centrifugation à 7 500xg pendant 10 minutes à 4°C. Les membranes de BmrA sont ensuite préparées comme décrit dans la partie matériel et méthodes du chapitre précédent.

### Solubilisation des protéines membranaires

La préparation membranaire est rapidement décongelée dans un bécher d'eau chaude puis placée dans la glace. Les membranes sont diluées à 5 mg de protéines/mL dans le tampon de solubilisation (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol, 10 mM imidazole, 1 mM DTT, 1 mM PMSF et pastilles anti-protéases). BmrA est ensuite extrait avec 1% (w/v) de détergent ( $\beta$ -DDM ou LMNG). Les membranes sont solubilisées pendant 2 heures à 4°C sur roue. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation à 100 000xg pendant 40 minutes à 4°C. BmrA extrait est ensuite purifié sur colonne d'affinité au nickel et chromatographie d'exclusion diffusion.

### Purification de BmrA en DDM et LMNG

#### a) Chromatographie d'affinité sur gel de nickel agarose

Une colonne Ni<sup>2+</sup> HiTrap Chelating de 5 ml (GE Healthcare) est équilibrée avec 25 ml de tampon A composé de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol, 10 mM imidazole, 1 mM PMSF, anti-protéases, DDM 0,07% (w/v) / LMNG 0,05% (w/v). Les protéines solubilisées sont chargées sur la colonne à 2 ml/min et la résine est lavée avec dix volumes de

tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol, 20 mM imidazole, 1 mM PMSF, anti-protéases et DDM 0,07% (w/v) / LMNG 0,05% (w/v). L'élution est réalisée avec le tampon B composé de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol, 250 mM imidazole, 1 mM PMSF, anti-protéases et DDM 0,07% (w/v) / LMNG 0,05% (w/v). Les fractions correspondant au pic d'élution sont ensuite regroupées et concentrées jusqu'à un volume de 500  $\mu$ l par centrifugation à 5000xg à travers une membrane d'ultrafiltration en cellulose possédant une limite d'exclusion de 50 kDa (Amicon Ultra de 15 ml, Millipore).

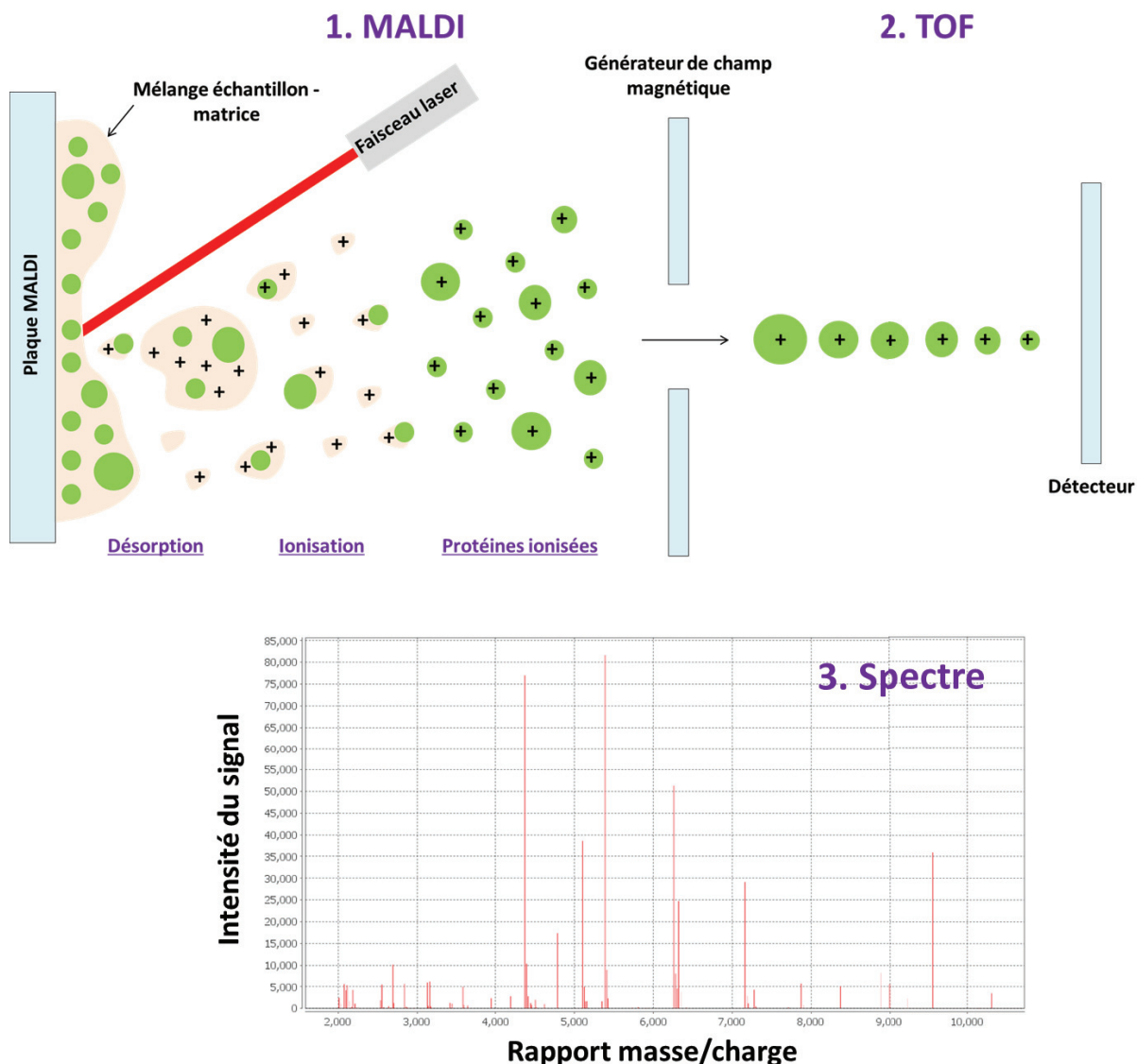
### **b) Chromatographie d'exclusion diffusion**

Une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) est équilibrée avec deux volumes de tampon 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, anti-protéases et 0,03% DDM (w/v) / 0,01% LMNG (w/v). L'échantillon concentré est injecté dans une boucle de 500  $\mu$ l puis chargé sur la colonne à un débit de 0,5 ml/min. BmrA est élué aux alentours de 12 ml et les fractions correspondant au pic sont regroupées. BmrA est ensuite concentré sur 50 kDa à 5000xg jusqu'à atteindre une concentration comprise entre 15 et 20 mg/ml pour les expériences de cristallogénèse.

### **La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF**

Nous avons utilisé la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans le but de déterminer la masse précise de BmrA en solution et ainsi contrôler l'homogénéité des échantillons purifiés en  $\beta$ -DDM et LMNG.

Cet appareil utilise une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI : Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF : Time-Of-Flight) (figure 60). BmrA purifié et concentré à 15 mg/ml est dilué dix fois dans une solution de  $\beta$ -DDM à 0,02% ou LMNG à 0,01% final (préparée dans l'eau). L'échantillon est déposé sur une lame et cristallisé dans une matrice. Un faisceau laser cible la matrice qui absorbe l'énergie et se vaporise libérant ainsi les peptides (désorption). Ceux-ci sont ensuite ionisés positivement. Ces ions sont détectés en mesurant le temps que met chaque particule à atteindre le détecteur (spectrométrie à temps de vol). La vitesse de chaque ion dépend de son rapport masse/charge. Ainsi, les particules les plus légères atteindront plus rapidement le détecteur que les particules lourdes. Dès lors que les ions parviennent au détecteur, le signal est amplifié puis traité par un ordinateur qui présente les résultats sous la forme d'un spectre où chaque pic correspond à un type de molécule. En ordonnées est représentée l'intensité du signal et en abscisses est indiquée la taille de la molécule en Daltons (Da).



**Figure 60 : Le principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.**

### Gel SDS-PAGE Tris-Tricine

Nous avons réalisé des gels SDS-PAGE Tris-tricine dans le but d'isoler et d'identifier des peptides de 3,5 et 7 kDa associés à BmrA après purification en  $\beta$ -DDM et LMNG.

Les gels SDS-PAGE Tris-glycine ne permettent pas de séparer les petites protéines inférieures à 15 kDa. Celles-ci sont capturées par les micelles de SDS qui migrent derrière le front d'ions et ne sont pas séparées. La solution pour parvenir à les dissocier des micelles de SDS est de remplacer la glycine par la tricine (un tripeptide de glycine) dans le tampon de migration. Le protocole suivi est celui mis au point par Schagger et von Jagow (Schagger et von Jagow, 1987).

Constituants	Concentration 4% 2 ml	Espaceur 10% 2 ml	Séparation 16,5% 6 ml
Acrylamide 49,5% (46,5% acrylamide, 3,0% bis acrylamide w/v)	480 µl	1,2 ml	2 ml
Tampon de migration (3M Tris-HCl pH 8,8, 0,3% SDS)	1,5 ml	2 ml	2 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 6 ml	qsp 6 ml	qsp 6 ml
Urée	-	-	2,2 g
Persulfate d'ammonium 10%	48 µl	20 µl	20 µl
TEMED	4,8 µl	2 µl	2 µl

**Tableau 13. Composition des gels SDS-PAGE Tris-tricine.**

Les échantillons protéiques sont incubés pendant 30 minutes dans un tampon dénaturant 2X composé de 4% SDS (w/v), 12% glycérol (v/v), 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,6 M  $\beta$ -mercaptoéthanol (v/v) et 0,2% de bleu de bromophénol. Dans le premier puit est déposé un standard de poids moléculaires compris entre 1,6 kDa et 26 kDa. Les peptides sont séparés sur un gel de polyacrylamide à 16,5%. La migration s'effectue avec des tampons nommés anode et cathode qui créent une différence de pH permettant une meilleure résolution. Celui à l'anode est composé de 0,2 M Tris-HCl pH 8,9 et celui à la cathode se compose de 0,1 M Tris pH 8,25, 0,1 M Tricine et 0,1% SDS. Le tampon cathode se situe entre les deux gels alors que le tampon anode est placé en bas de la cuve de gel. L'électrophorèse est réalisée à 30 V pour l'étape de concentration ( $\approx$  1 h) puis à 100 V pour la séparation pendant environ 5 h. Le gel est ensuite coloré avec une solution comprenant 50% méthanol, 10% acide acétique et 0,025% bleu de coomassie G250 pendant 1 h puis décoloré avec 10% d'acide acétique pendant une nuit sous agitation.

### Cristallogénèse de la protéine BmrA

Tous les essais de cristallisation ont été réalisés en boîtes 96 puits selon le principe de diffusion de vapeur par la technique de la goutte suspendue à l'aide du robot de nanopipetage Mosquito de la plate-forme de cristallogénèse de l'IBCP. Des gouttes de 0,5 µl, composées de 250 nl de solution protéique (BmrA en général à 10 mg/ml) et 250 nl de solution de cristallisation (ratio 1:1) ont été mises à équilibrer à 4°C et 20°C contre un réservoir contenant 100 µl de solution de cristallisation. Nous avons réalisé par le biais de cette méthode un large criblage des conditions de cristallisation à l'aide des kits commerciaux PEGs suite I<sup>3</sup>, II<sup>4</sup> et MPD<sup>5</sup>. Ils permettent de tester plusieurs paramètres comme la nature et la concentration du PEG, la nature du sel et le pH (figure 61). D'autres kits ont également été utilisés comme

<sup>3</sup> [http://www.ibcp.fr/sites/www.ibcp.fr/IMG/pdf/Compo\\_PEGs\\_I\\_.pdf](http://www.ibcp.fr/sites/www.ibcp.fr/IMG/pdf/Compo_PEGs_I_.pdf)

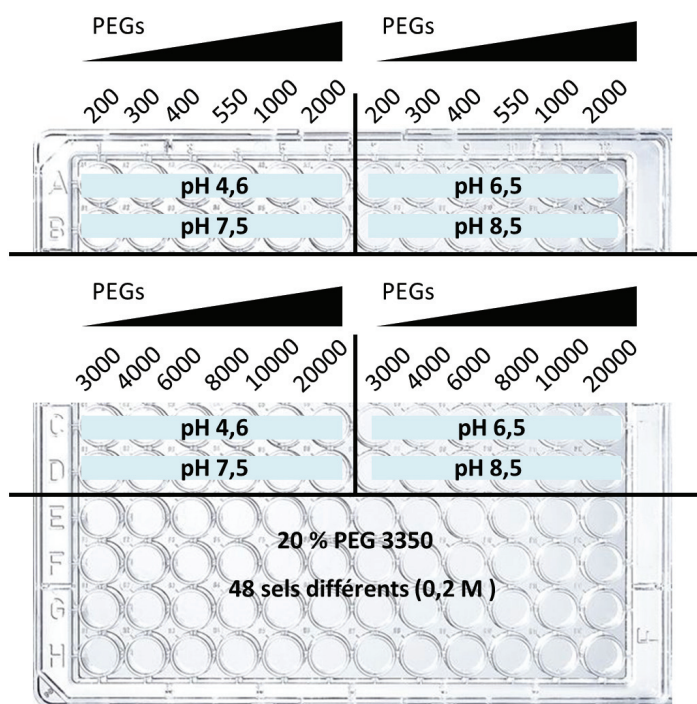
<sup>4</sup> [http://www.ibcp.fr/sites/www.ibcp.fr/IMG/pdf/Compo\\_PEGsII.pdf](http://www.ibcp.fr/sites/www.ibcp.fr/IMG/pdf/Compo_PEGsII.pdf)

<sup>5</sup> [http://www.ibcp.fr/sites/www.ibcp.fr/IMG/pdf/MPD\\_compo.pdf](http://www.ibcp.fr/sites/www.ibcp.fr/IMG/pdf/MPD_compo.pdf)

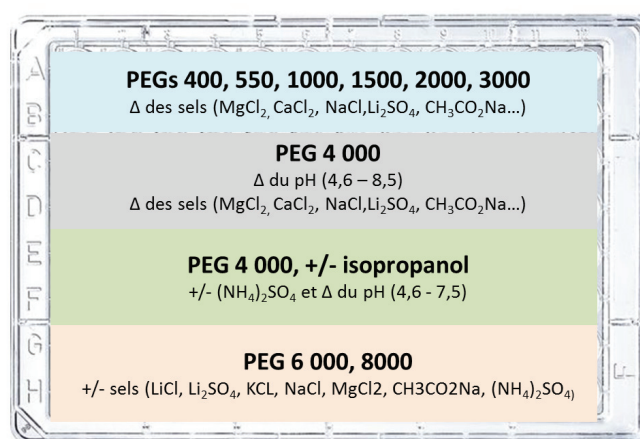
Mb Class I, II et JCSG+. Le détail précis des expériences qui ont été menées est rapporté dans le tableau 14 ci-après.

Des essais de co-cristallisation de BmrA ont été réalisés en présence de nucléotides (ATP-Mg<sup>2+</sup> et AMPPNP) et substrats (doxorubicine, GF 120918) dans le but de stabiliser les domaines nucléotidiques et transmembranaires de BmrA dans une conformation fermée, moins flexible que la forme apo. Cette méthode consiste à incuber BmrA avec le ligand pendant 2 h à 4°C avant de réaliser les essais de cristallisation afin qu'ils puissent interagir en solution. Les gouttes ont été obtenues comme précédemment en mélangeant 250 nl de la solution protéique (BmrA en général à 10 mg/ml, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,03%  $\beta$ -DDM ou 0,01% LMNG et le ligand à 2 ou 3 mM) avec 250 nl de la solution de cristallisation.

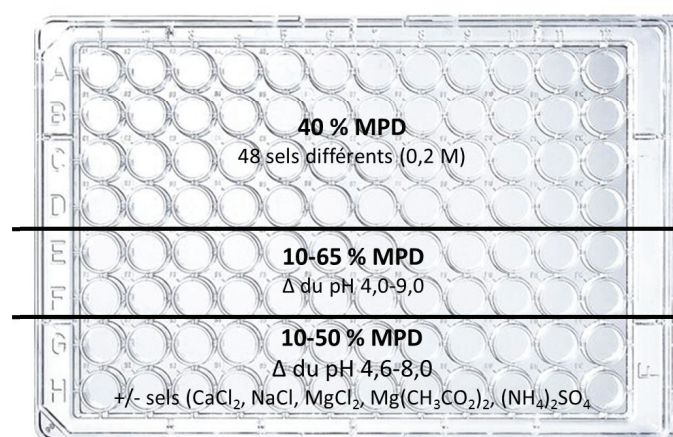
### A) PEGs I suite



### B) PEGs II suite



### C) MPD suite



### Figure 61: Composition des principaux kits commerciaux utilisés.

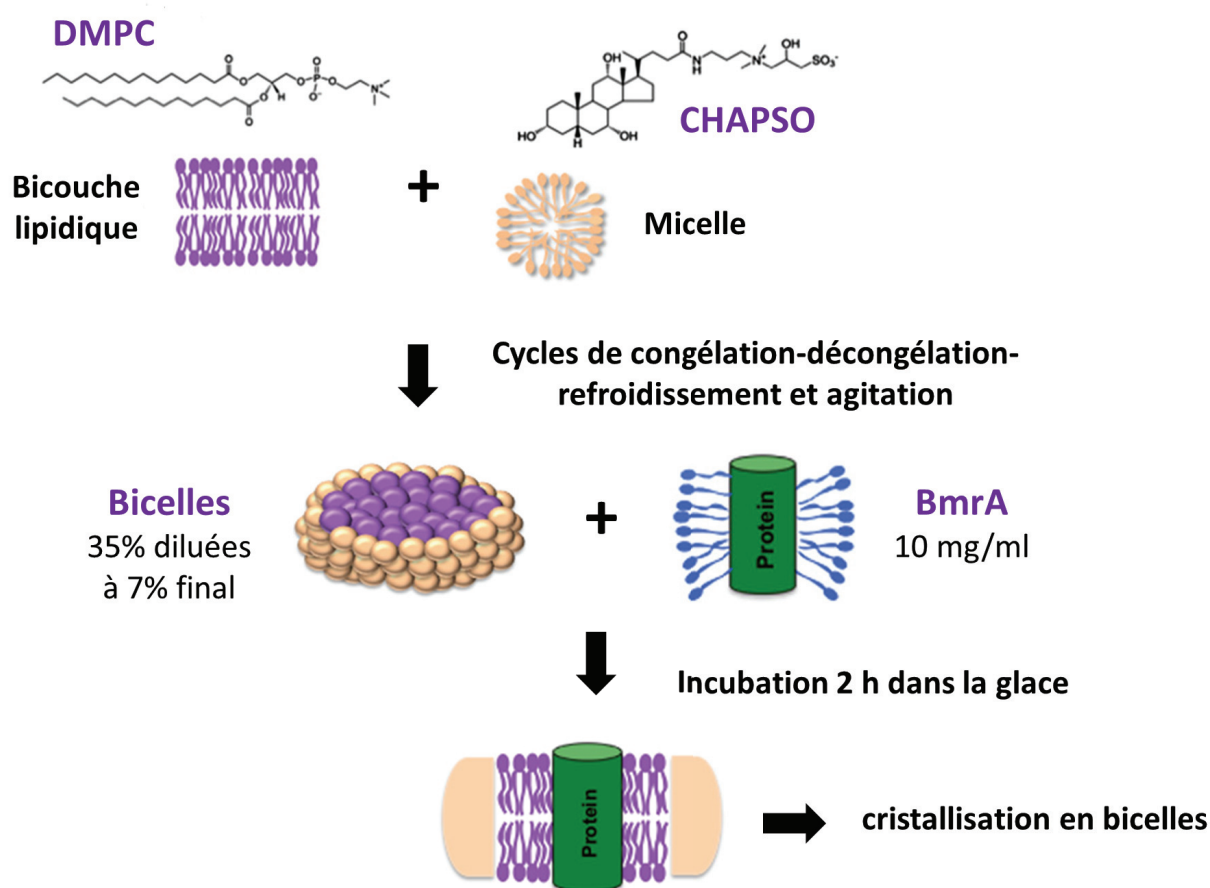
Les conditions initiales de cristallisation sont recherchées par un criblage de conditions en utilisant des kits commerciaux. Le symbole  $\Delta$  représente la variation des sels ou du pH.

Des essais de cristallisation de BmrA en bicelles ont également été entrepris à 19°C (figure 62). Une bicelle peut être considérée comme une bicouche lipidique de taille finie qui



s'obtient par l'addition de détergent comme le CHAPSO sur des lipides à longues chaînes (DMPC). Ce mélange s'assemble spontanément sous forme de disque où les lipides forment une bicouche protégée de l'eau par les molécules de détergent qui se placent sur la tranche du disque. Les dimensions de la bicelle dépendent du ratio DMPC : CHAPSO. La première étape du protocole consiste à préparer la solution de bicelles à 35% avec un ratio DMPC : CHAPSO de 2,8 :

Une solution de CHAPSO à 13,4% (w/v) est préparée dans l'eau. 262,6 mg de DMPC sont ensuite pesés et dissous dans 650  $\mu$ l de la solution de CHAPSO. Plusieurs cycles de congélation dans l'azote liquide-incubation à 55°C-refroidissement dans la glace-agitation au vortex sont nécessaires pour dissoudre les lipides et obtenir une solution claire et limpide. BmrA à 10 mg/ml est ensuite incubé avec la solution de bicelles diluée à 7% final dans la glace pendant 2 h. Les gouttes sont ensuite réalisées comme décrit précédemment.



**Figure 62 : Le principe de formation des bicelles.**

Adapté d'Ujwal et Bowie, 2011.



BmrA	Détergent	[BmrA] mg/ml	°C	Kit	Substrat	Taille de la goutte	Ratio Pro./Pré.
Sauvage	$\beta$ -DDM	5	19	PEG I	+/- ATP-VO <sub>4</sub> (5 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
					AMP-PNP (1 mM)		
					Doxorubicine (2 mM)		
				PEG II	+/- ATP-VO <sub>4</sub> (5 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
					AMP-PNP (1 mM)		
					Doxorubicine (2 mM)		
				MPD	+/- ATP-VO <sub>4</sub> (5 mM) Doxorubicine (2 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
E504A	$\beta$ -DDM	10	19	PEG I	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM) Doxorubicine (2 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
				PEG II	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM) Doxorubicine (2 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
				MPD	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM) Doxorubicine (2 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
				JCSG+	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM) Doxorubicine (2 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
			4	Mb Class I	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
				Mb Class II	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
				PEG I	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
					GF 120918 (3 mM)		
					Doxorubicine (2 mM)		
	$\beta$ -DDM	15	4	PEG II	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM)	0,5 $\mu$ l	1 :1
					GF 120918 (3 mM) + ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM)		
					Doxorubicine (2 mM) + ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM)		
				MPD	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM) GF 120918 (3 mM) + ATP-MgCl <sub>2</sub> (5 mM) Doxorubicine (2 mM) +	0,5 $\mu$ l	1 :1

				ATP-MgCl <sub>2</sub>			
				PEG I	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (2 mM)		
E504A	Bicelles B-DDM	10	19	PEG II	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	0,5 µl	1 :1
				MPD	+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (2 mM)		
		10			+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (2 mM)		
	LMNG	5	19	PEG I	GF 120918 (3 mM)	0,5 µl	1 :1
		15			Apo		
		10			+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (2 mM)		
E504A	LMNG	5	19	PEG II	GF 120918 (3 mM)	0,5 µl	1 :1
		15			Apo		
		10			+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (2 mM)		
				MPD	GF 120918 (2 mM)		
		10	19		+/- ATP-MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	0,5 µl	1 :1
				JCSG+	GF 120918 (2 mM)		

**Tableau 14. Essais de cristallisation réalisés sur BmrA purifié en β-DDM et LMNG.**

Le ratio Pro./Pré. désigne le ratio protéine/précipitant. La doxorubicine est un agent anticancéreux utilisé dans la chimiothérapie du cancer. Le GF120918 est un inhibiteur de BmrA et de la glycoprotéine-P.

## B. RESULTATS

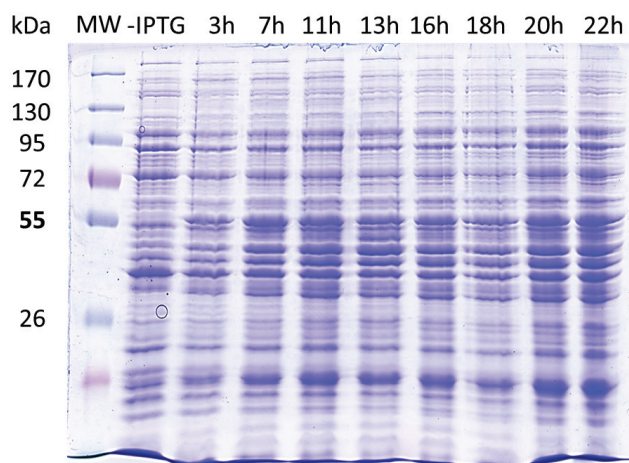
### Expression de BmrA dans C43(DE3) Δ*acrB* d'*E. coli*

L'utilisation de la souche C43(DE3) Δ*acrB* d'*E. coli* nous a conduit dans un premier temps à ajuster le protocole d'expression de BmrA en testant plusieurs paramètres comme la température (20, 23, 25 et 30°C), la densité optique à laquelle est déclenchée l'expression protéique et la durée d'expression.

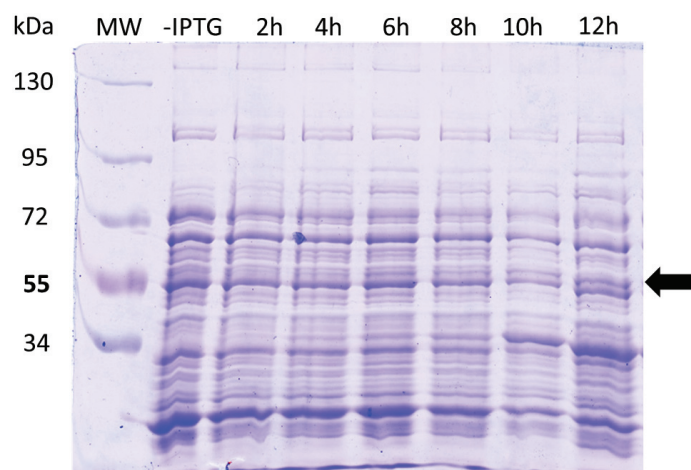
BmrA est efficacement produit en milieu LB à 25°C (protocole détaillé dans la partie matériel et méthodes) comme l'atteste le suivi de l'expression en fonction du temps sur gel SDS-PAGE (figure 63a). L'analyse de la préparation membranaire indique que le transporteur représente environ 50% des protéines totales exprimées (figure 63c, puit 2). A cette température d'expression, moins de 10% des protéines totales de BmrA sont extraites en β-DDM alors qu'elles sont très efficacement solubilisées en foscholine 12 (figure 63c). Ceci nous a donc conduits à réduire la température d'expression dans le but d'améliorer le repliement

de la protéine. Mais à 20°C, BmrA n'est pas produit comme le montre le suivi de l'expression en fonction du temps sur gel SDS-PAGE (figure 63b).

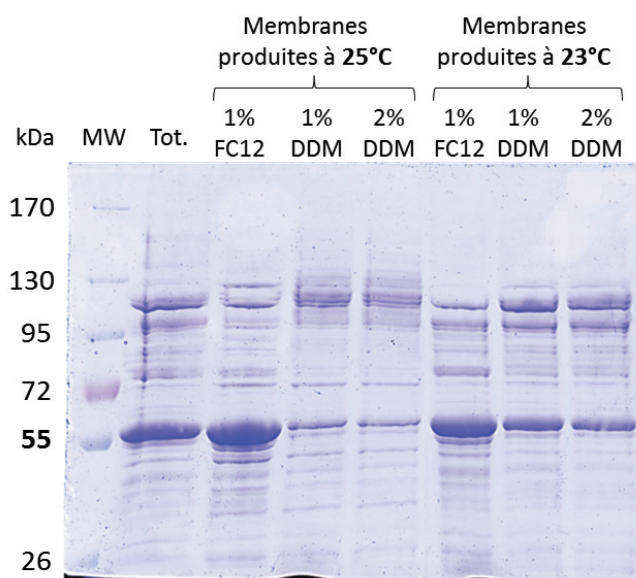
#### a) Expression de BmrA à 25°C



#### b) Expression de BmrA à 20°C



#### c) Extraction de BmrA après expression à 23°C et 25°C



**Figure 63 : Comparaison de l'expression et extraction de BmrA dans C43(DE3)  $\Delta$ acrB à 20, 23 et 25°C.**

Gels SDS-PAGE 10% du suivi de l'expression de BmrA en fonction du temps a) à 25°C et b) à 20°C. La flèche noire aux alentours de 55 kDa indique la position où doit migrer BmrA. C) Comparaison de l'extraction de BmrA après expression à 23°C et 25°C. Les protéines sont solubilisées en présence de 1% ou 2% de  $\beta$ -DDM pendant 2 h à 4°C puis centrifugées à 100000xg pendant 40 minutes. Le surnageant contenant les protéines extraites est déposé sur gel SDS-PAGE 10%. La foscholine 12 est utilisée comme contrôle positif.

A une température intermédiaire (23°C), le niveau et le rendement d'expression sont similaires à ceux obtenus à 25°C. Les tests d'extraction réalisés sur cette préparation membranaire montrent cette fois-ci que le  $\beta$ -DDM permet d'extraire environ 40% des protéines totales de BmrA, une efficacité qui est comparable à celle obtenue précédemment pour BmrA produit à 25°C dans la souche C41 (DE3).

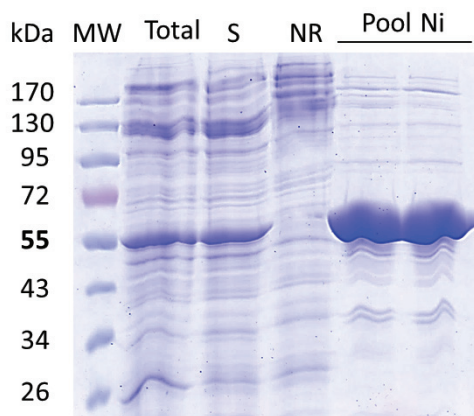
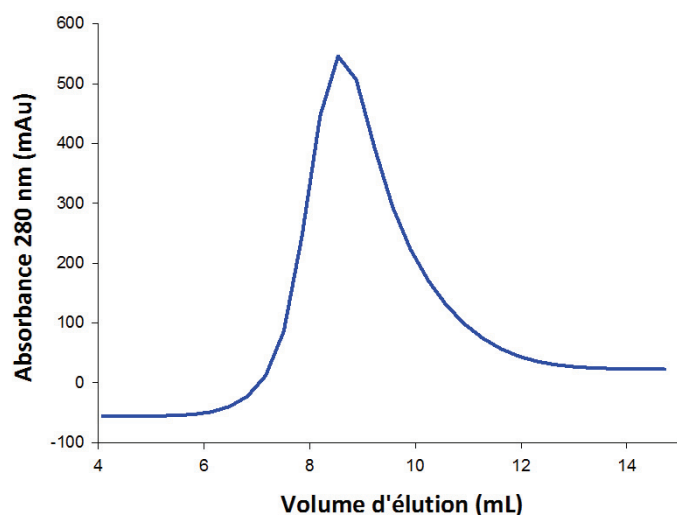
Cette rapide optimisation montre que la température d'expression dans la souche C43 d'*E. coli* est un élément critique pour le bon repliement de BmrA et la suite des étapes d'extraction et de purification. Pour toute la suite des expériences, l'expression de BmrA

sauvage et E504A a donc été réalisée précisément à 23°C et déclenchée en début de phase exponentielle ( $DO \approx 0,5-0,6$ ) par l'ajout de 0,7 mM IPTG pendant 7 h.

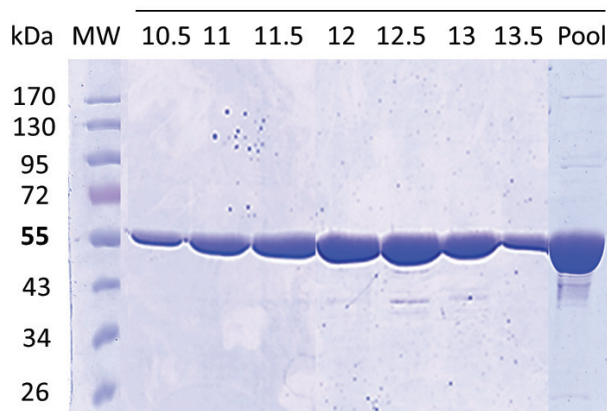
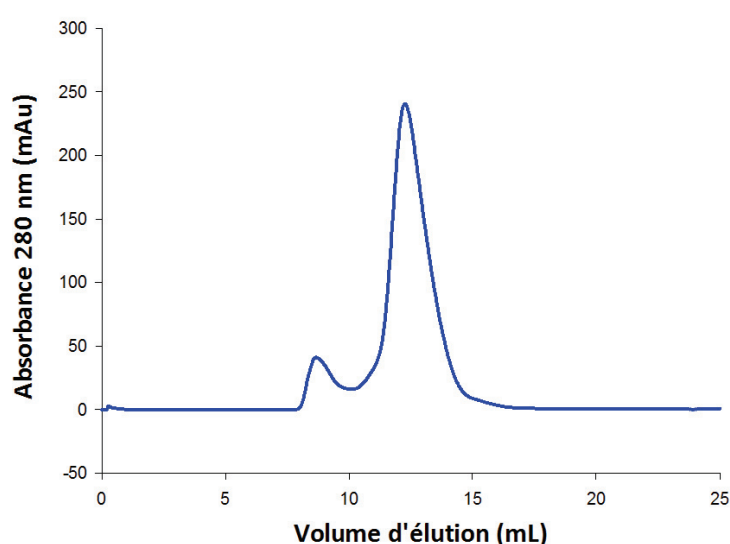
### Purification et cristallisation de BmrA sauvage en $\beta$ -DDM

Les membranes enrichies en BmrA sauvage ont été solubilisées par 1% (w/v) de DDM. Le surnageant obtenu a ensuite été soumis à une première étape de purification par chromatographie d'affinité sur résine de nickel agarose selon le protocole décrit dans la partie matériel et méthodes. Les protéines retenues sont éluées avec 250 mM d'imidazole en solution dans le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol et 0,07% (w/v) DDM. Le profil d'éluion et le gel correspondant (illustrés dans la figure 64a) montrent que BmrA est purifié efficacement. La protéine est ensuite chargée sur colonne Superdex 200 en présence de 0.03% de DDM.

#### a) Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel



#### b) Chromatographie d'exclusion-diffusion



**Figure 64 : Purification de BmrA sauvage en  $\beta$ -DDM.**

a) Profil d'éluion de la chromatographie d'affinité sur nickel agarose et gel SDS-PAGE 10%. Piste 2 : la préparation membranaire (total), piste 3 : le surnageant correspondant aux protéines extraites (S), piste 4 : la fraction non retenue sur colonne  $Ni^{2+}$ -NTA (NR), pistes 5 et 6 : les fractions du pic d'éluion rassemblées. B) Chromatogramme et gel SDS-PAGE 10% des fractions du pic principal obtenu lors de la chromatographie d'exclusion diffusion.

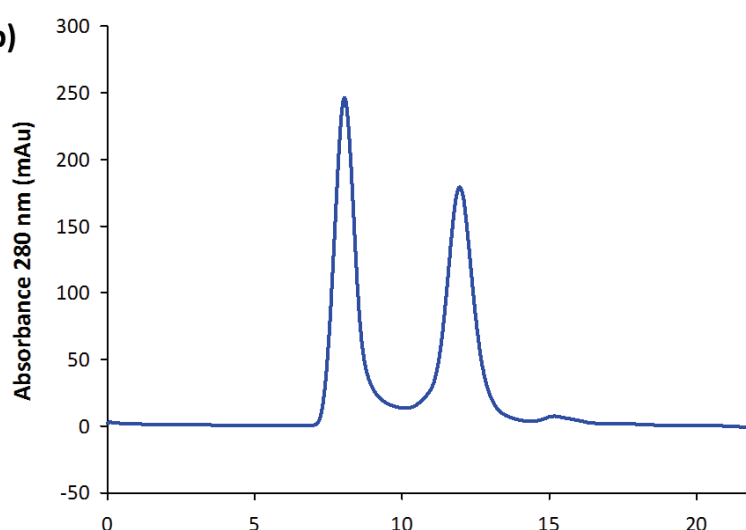
Le chromatogramme et l'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide 10% des fractions éluées sont présentés dans la figure 64b. Deux pics d'élution sont observés : le premier, très minoritaire, se situe à environ 8 ml (volume mort de la colonne) et correspond à un état d'agrégation de la protéine; le second à 12 ml correspond à une taille estimée de 350 kDa, ce qui coïncide avec la taille d'un homodimère de BmrA en présence de molécules de DDM et de lipides associés (Ravaud et *al.*, 2006). Ce pic est fin et symétrique, ce qui indique un degré important d'homogénéité et de monodispersité. L'analyse sur gel SDS-PAGE montre que BmrA présente un degré final de pureté supérieur à 95%, ce qui est très satisfaisant en vue des essais de cristallisation. La protéine subit une légère dégradation protéolytique comme en atteste les quelques bandes contaminantes juste en dessous de 55 kDa. On note bien l'absence à 110 kDa de la bande correspondant à AcrB.

Les fractions du second pic de la chromatographie d'exclusion sont rassemblées et ensuite concentrées sur le système « Amicon ultra » de Millipore avec un seuil de coupure de 50 kDa. BmrA sauvage a pu être concentrée jusqu'à 7 mg/ml maximum. Après gel filtration et concentration de l'échantillon, la quantité de protéine perdue augmente de façon très significative comme le montre le tableau de rendement de la figure 65a.

a)

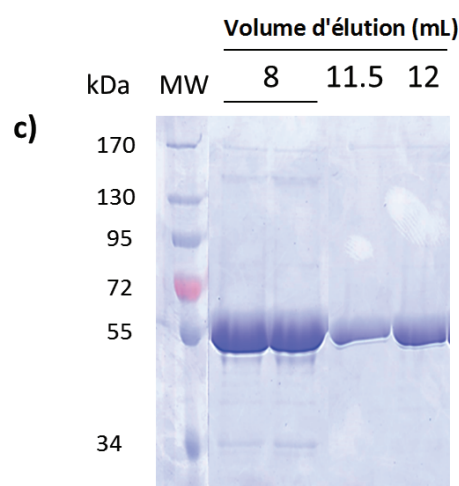
Fraction	mg de protéines
Préparation membranaire	360
Extraction	170
Colonne de nickel	16
Concentration 50 kDa	14
Gel filtration	7
Concentration 50 kDa	1,5 (7 mg/ml max.)

b)



### Figure 65 : BmrA sauvage précipite lors de l'étape de concentration.

A) Tableau de rendement des différentes étapes de purification de BmrA sauvage à partir de deux litres de culture. B) Profil d'élution de BmrA qui après concentration est injecté sur la colonne d'exclusion Superdex 200. C) Les fractions éluées à 8, 11.5 et 12 ml sont analysées sur gel de polyacrylamide 10%.





Le protocole de purification permet finalement d'isoler environ 1,5 mg de BmrA à partir de 360 mg de protéines totales (soit 2 L de culture). En vue des essais de cristallisation, nous avons voulu vérifier l'homogénéité finale de BmrA, la fraction concentrée a donc été injectée sur colonne d'exclusion Superdex 200. Le chromatogramme et le gel correspondant (illustrés dans la figure 65) confirment que près de 70% de BmrA s'agrège lors cette étape. Considérant la précipitation importante de la protéine lors de la concentration, nous avons regroupé les fractions correspondant au second pic d'élution et avons concentré l'échantillon jusqu'à 5 mg/ml sur 50 kDa pour les essais de cristallisation.

Ces essais ont tous été réalisés selon le principe de diffusion de vapeur par la technique de la goutte suspendue. Des kits commerciaux ont dans un premier temps été utilisés dans le but de tester un large panel de conditions différentes de tampons, pH et précipitants. Ce premier criblage d'environ 800 conditions nous a permis d'évaluer l'influence de différents paramètres sur la solubilité de BmrA :

- ⊕ **L'influence du pH** : Le kit PEG I a clairement permis de mettre en évidence le fait qu'à pH acide (4.6) la protéine s'agrège complètement quel que soit la nature du PEG utilisé. Des pH compris entre 7.5 et 9 semblent donc à privilégier comme le montre l'aspect des différentes gouttes de cristallisation de la figure 66.
- ⊕ **L'influence de la nature du précipitant** : beaucoup de précipités amorphes ont été observés dans les gouttes réalisées avec les PEGs de poids moléculaire supérieurs à 1000 Da. Les PEGs de poids moléculaire inférieurs à 1000 kDa conduisent en revanche à des précipités plus légers et fins.
- ⊕ **L'influence de la concentration de PEG** : Le kit PEG II nous a permis de réaliser une analyse plus fine de l'influence de la concentration des précipitants. Ainsi, il apparaît clairement évident que pour éviter l'aggrégation de la protéine, les PEGs de haut poids moléculaire comme le PEG 8000 doivent être utilisés à des concentrations inférieures à 10% alors que la concentration des PEGs de faible poids moléculaire comme le PEG 400 peut atteindre 20% (figure 67).
- ⊕ **L'influence du solvant organique** : Le kit MPD nous a permis de tester un autre agent précipitant couramment utilisé, le methyl-2, 4 pentanediol (MPD). Il maintient la protéine dans une phase soluble lorsqu'il est utilisé à une concentration inférieure à 30%. Au-delà, la solubilité de BmrA diminue et la protéine précipite à partir de 40%.
- ⊕ **L'influence des sels** : Les autres précipitants, tels que les sels semblent assez inefficaces pour diminuer la solubilité de la protéine puisque la majorité des gouttes restent limpides même à forte concentration de précipitant.
- ⊕ **L'influence des substrats** : La co-cristallisation en présence de substrats et nucléotides conduit généralement à des gouttes très précipitées quel que soit la nature de l'agent précipitant.



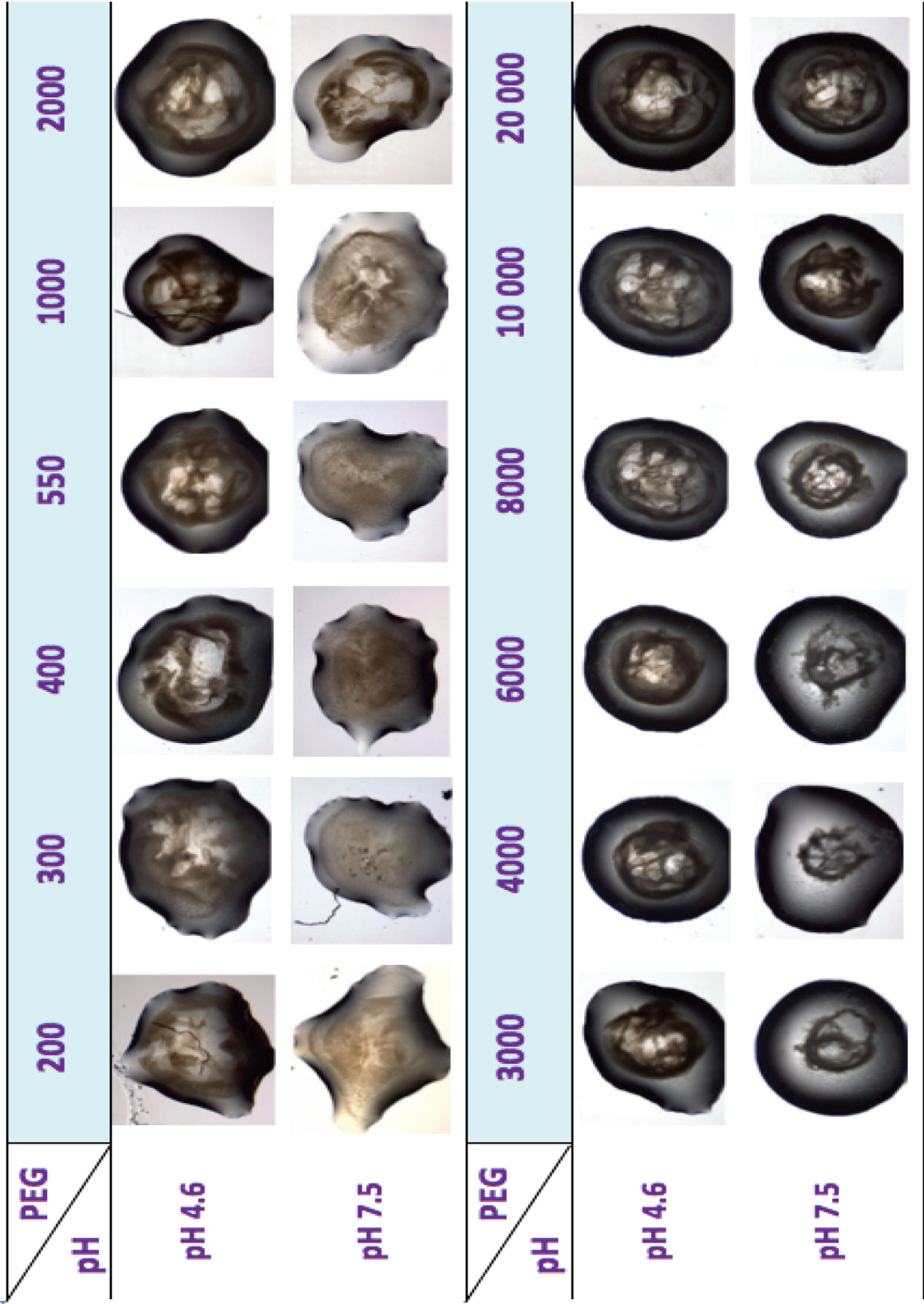




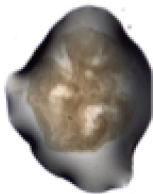
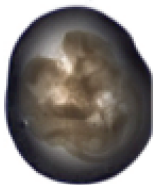
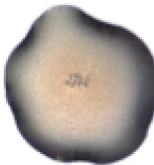
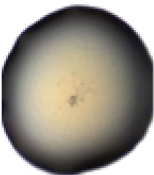

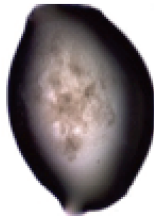


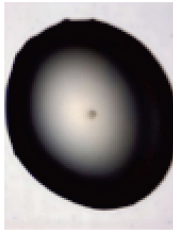
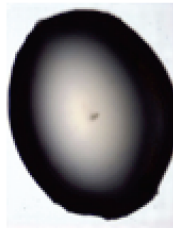
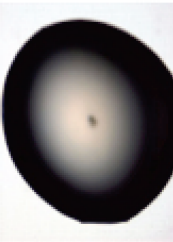

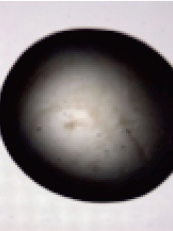
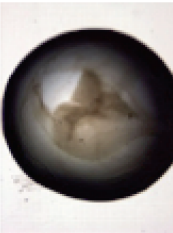
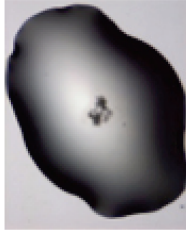
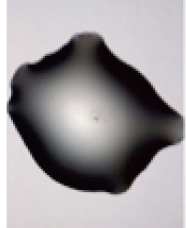
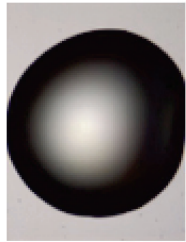
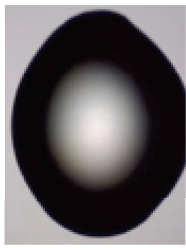
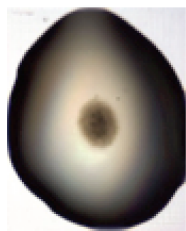
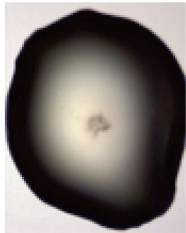


Figure 66 : Aspect des gouttes de cristallisation de BmrA sauvage en DDM en fonction de la nature du PEG et du pH.

Technique de la goutte suspendue. [BmrA] = 8 mg/ml. Kit PEG I. Gouttes 0,5 µl. Ratio protéine/précipitant : 1/1.

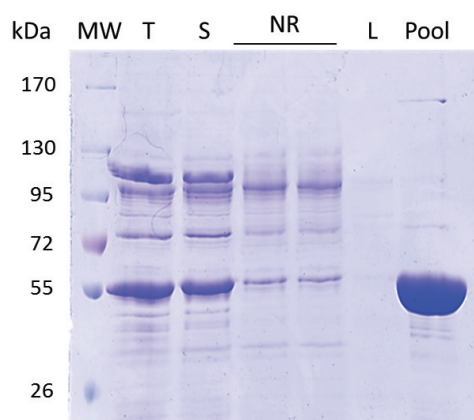
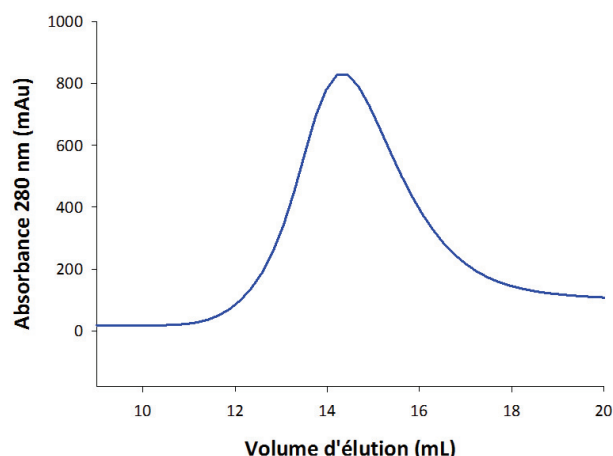
[PEG 400] %	10	15	20	25	28	30
						
	2	4	8	10	15	30
						
	10	15	20	30	40	65
						
Sels	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaCl	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> MgO <sub>4</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
						

Plusieurs mois après la réalisation des boîtes, aucune des 800 conditions de cristallisation n'a permis d'obtenir de cristal. Presque toutes les conditions de cristallisation conduisent à la formation de précipités et d'agrégats. Comme nous l'avons vu précédemment, BmrA sauvage est instable et flexible en solution en DDM et a tendance naturellement à s'agréger. Il semble donc très difficile de parvenir à cristalliser la protéine sauvage en DDM.

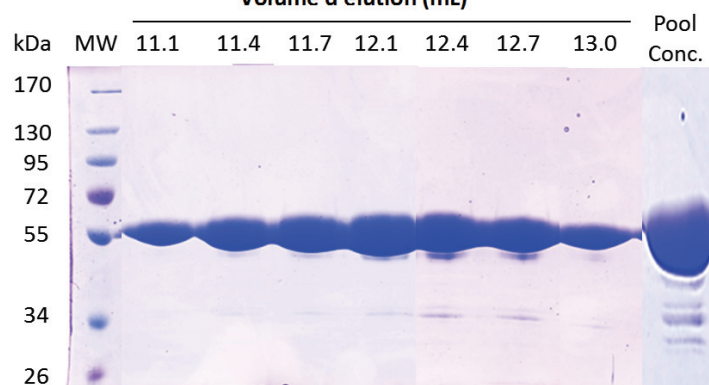
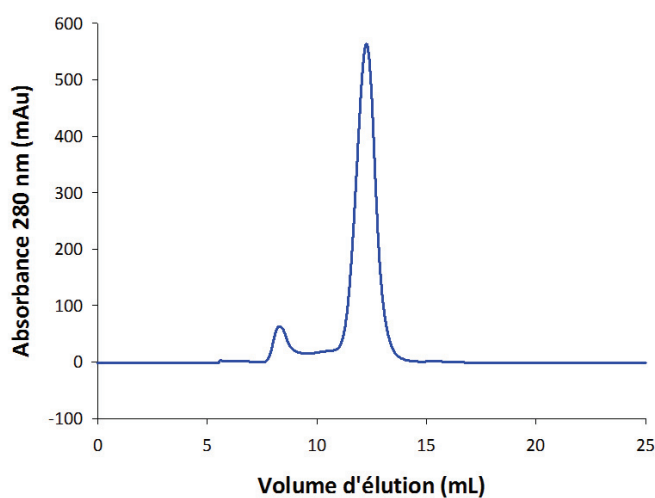
### **Purification et cristallisation de BmrA E504A en $\beta$ -DDM**

Nous avons ensuite utilisé le mutant inactif E504A de BmrA. Ce mutant du domaine cytoplasmique présente, rappelons le, la propriété de fixer l'ATP sans l'hydrolyser, ce qui permettrait en théorie de cristalliser la protéine dans des conformations intermédiaires plus stables et moins flexibles que la protéine sauvage. Le mutant E504A de BmrA a été surproduit et purifié suivant le même protocole que la protéine sauvage. La surproduction dans la souche C43 (DE3)  $\Delta acrB$  a été très efficace puisque nous avons obtenu une concentration en protéines totales de 50 mg/ml dans les membranes, plus élevée que pour la protéine sauvage (30 mg/ml). Les membranes enrichies en BmrA E504A ont été solubilisées par 1% de DDM puis la protéine a été purifiée par deux étapes de chromatographie sur FPLC (comme décrit pour la protéine native). Le profil d'élution de la protéine et le gel SDS-PAGE 10% correspondant lors de la chromatographie d'affinité sont présentés sur la figure 68a.

### a) Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel



### b) Chromatographie d'exclusion-diffusion

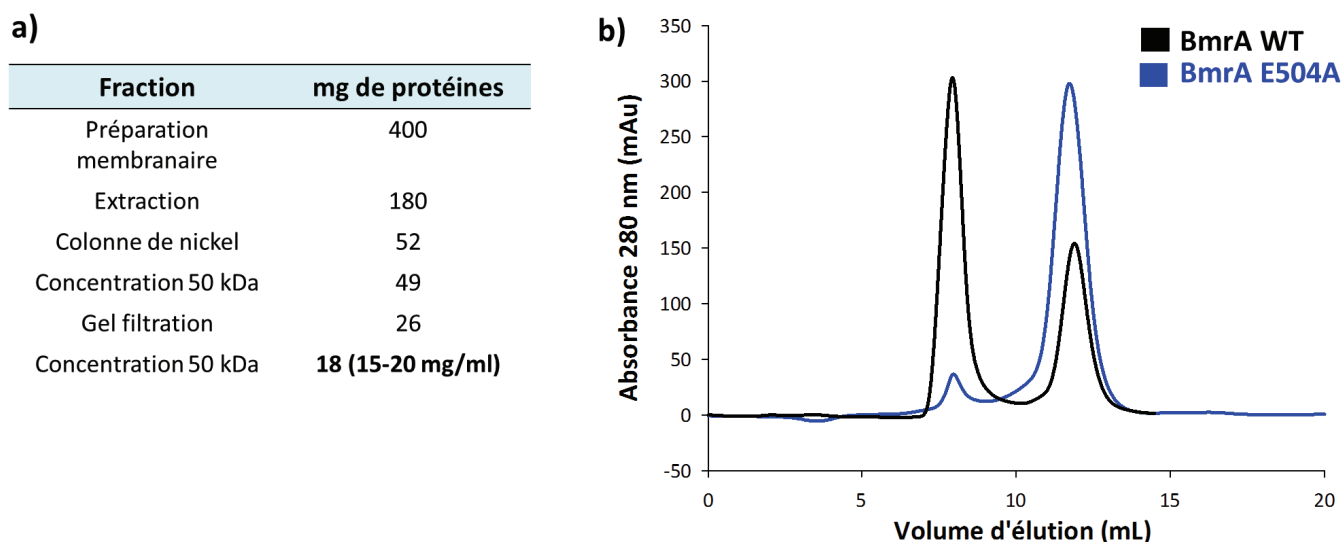


**Figure 68 : Purification de BmrA E504A en  $\beta$ -DDM.**

a) Profil d'élution de la chromatographie d'affinité sur nickel agarose et gel SDS-PAGE 10% correspondant. Piste 2 : la préparation membranaire (total), piste 3 : le surnageant correspondant aux protéines extraites (S), pistes 4 et 5 : la fraction non retenue sur colonne  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (NR), piste 6 : la fraction non retenue après lavage (L) et piste 7 : les fractions correspondant au pic d'élution sont regroupées. B) Chromatogramme et gel SDS-PAGE 10% des fractions du pic principal obtenu lors de la chromatographie d'exclusion diffusion (dépôt 20  $\mu\text{l}$ ).

Comme pour la protéine sauvage, BmrA E504A est purifié très efficacement. Les fractions du pic d'élution sont ensuite regroupées et l'échantillon est chargé sur colonne Superdex 200 en présence de 0.03% DDM. Le profil d'élution de la protéine lors de la chromatographie d'exclusion (figure 68b) montre à nouveau deux pics. Le premier à 8 ml est toujours très minoritaire et le second à 12 ml est parfaitement symétrique, indiquant un degré important de monodispersité. Les fractions issues de cette seconde étape de chromatographie ont été analysées sur gel SDS-PAGE (figure 68b). Le degré final de pureté est identique à celui obtenu avec la protéine sauvage. Mais cette fois-ci l'échantillon a pu être concentré sur 50 kDa jusqu'à 20 mg/ml. Les rendements obtenus avec le mutant E504A sont beaucoup plus importants par rapport à BmrA sauvage (figure 69a). Le protocole permet de purifier 18

mg de BmrA E504A, soit douze fois plus que la protéine sauvage (1,5 mg pour rappel). Pour comparer la stabilité du mutant à celle du sauvage, nous avons également injecté l'échantillon concentré sur colonne d'exclusion Superdex 200. La superposition des deux chromatogrammes est illustrée dans la figure 69b.



**Figure 69 : Le mutant E504A est plus stable en solution que la forme sauvage.**

a) Le tableau de rendement des différentes étapes de purification de BmrA E504A à partir de deux litres de culture. B) Superposition des profils d'élution de BmrA qui après concentration a été injecté sur la colonne d'exclusion Superdex 200. Les courbes noire et bleu représentent respectivement l'absorbance à 280 nm des formes sauvage et mutée de BmrA.

Le pic d'agrégats de protéines à 8 ml est beaucoup plus important avec la forme sauvage. La mutation E504A augmente significativement la stabilité de la protéine en solution. Ce résultat est très encourageant en vue des expériences de cristallo-genèse. Les fractions du second pic d'élution ont donc été regroupées et concentrées sur 50 kDa jusqu'à 15 mg/ml.

Un criblage de 3648 nouvelles conditions de cristallisation a ainsi été réalisé à 19°C et 4°C sur la protéine E504A auquel nous avons préalablement ajouté de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (5 mM final), de la doxorubicine (2 mM) ou un inhibiteur de la glycoprotéine P, le GF120918 (3 mM). Ces essais ont été réalisés comme décrit dans la partie matériel et méthodes, en utilisant les kits commerciaux PEGs I, II, JCSG+, Mb Class I et II.

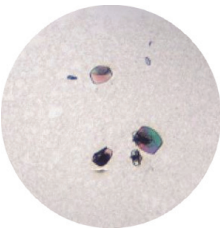
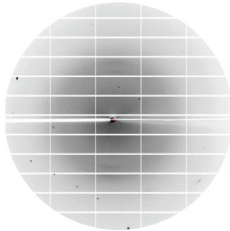

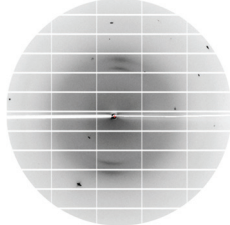
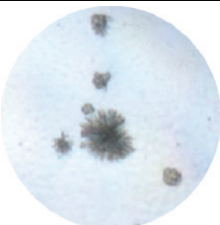
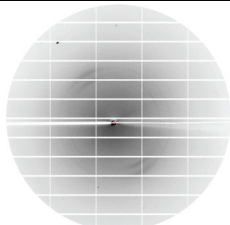
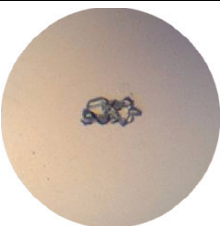
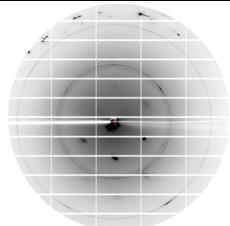

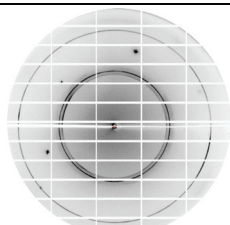

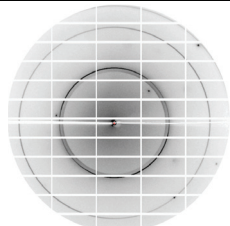
Ces expériences tendent à confirmer que le mutant E504A est beaucoup plus soluble en solution que la protéine sauvage puisque dans les mêmes conditions, nous avons obtenu des gouttes limpides pour les PEGs de bas poids moléculaire et des précipités plus fins et légers pour les PEGs de hauts poids moléculaire. Les autres précipitants tels que les sels ou les solvants organiques semblent cette fois-ci très efficaces pour diminuer la solubilité de la protéine puisque nous avons obtenu de nombreux cristaux en présence de MPD et de sels d'ammonium. La co-cristallisation en présence de nucléotides et de substrats conduit en revanche à des gouttes globalement très précipitées quelque soit la nature de l'agent précipitant.


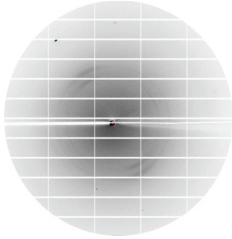

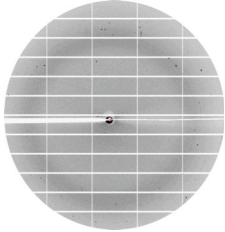

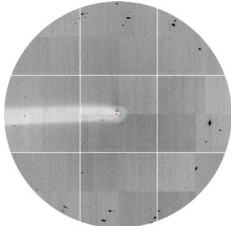

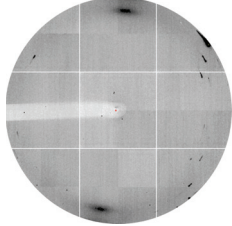
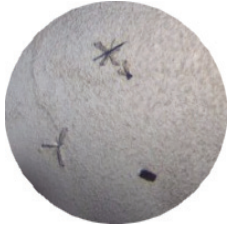
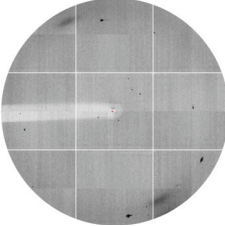

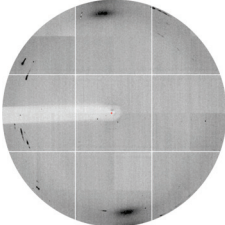
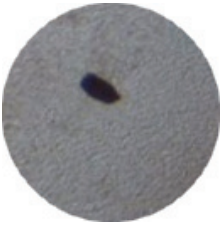
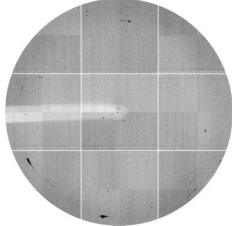
Dans le mois qui a suivi la réalisation de ces gouttes, nous avons obtenu au total dix-neuf cristaux. Le tableau 15 ci-dessous détaille l'ensemble de ces conditions de cristallisation. La quasi-totalité de ces cristaux a été obtenue à 20°C dans la forme apo. Il est intéressant de noter que six cristaux ont été obtenus en présence de sels d'ammonium utilisé seul et sept autres en combinant les sels d'ammonium avec des précipitants comme le MPD ou le PEG 400. Des formes très différentes de cristaux ont été obtenues : des étoiles ou des baguettes à 4°C et des micro-cristaux ou des petites sphérulites à 20°C. Ils apparaissent généralement au milieu de la goutte et sont assez petits. Deux cristaux ont également été obtenus en bicelles : le premier est apparu en présence de PEG 4000 et se situe sous un précipité assez important au sein de la goutte; le second a été obtenu en présence de PEG 8000 et a la forme d'une très fine baguette.

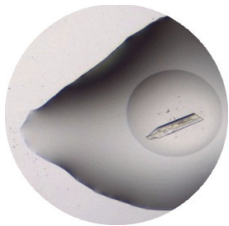
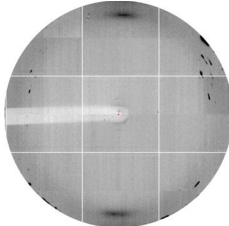
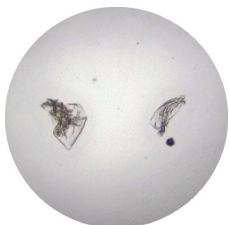
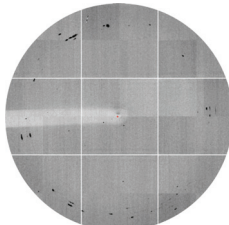
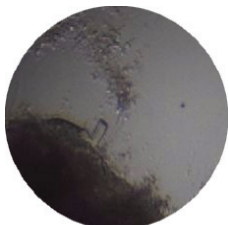
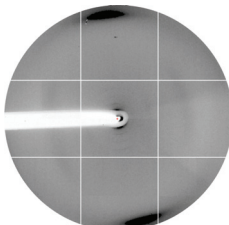
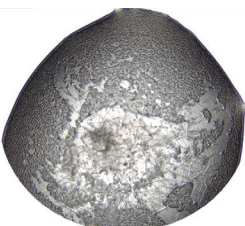
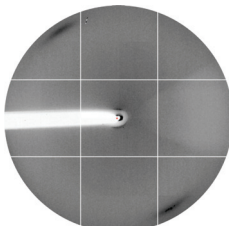
Le pouvoir diffractant de ces cristaux a été testé sur la ligne de lumière Proxima 1 à Soleil (Paris). Comme nous pouvons le voir sur les clichés de diffraction pris à 0° et 90°, aucune tache de diffraction n'est observée à basse résolution. Au contraire, quelques spots intenses et éloignés les uns des autres sont présents à haute résolution. Il ne fait donc guère de doute que ces cristaux sont en réalité des cristaux de sel et non de protéine. Pour les cristaux obtenus en bicelles, en absence de sels, aucune tache de diffraction n'est observée ni à haute ni à basse résolution. Mais pour autant il ne s'agit sans doute pas de cristaux de protéine, la technique des bicelles conduit en effet souvent à l'apparition de faux positifs.

Les essais de cristallisation réalisés sur BmrA E504A en DDM sont donc particulièrement décevants dans la mesure où aucun cristal de protéine n'a été obtenu malgré la très bonne homogénéité et pureté de l'échantillon purifié.



Kit Température	Conditions de cristallisation	Aspect des cristaux 456 $\mu\text{m}$	Cliché de diffraction
Mb Class I (A8) 20°C	4% isopropanol 1.4 M sulfate d'ammonium 0.1 M acétate d'ammonium		
Mb Class I (A10) 4°C	3.5 M sulfate d'ammonium 0.25 M NaCl 0.05 M Na/K phosphate pH 7.5		
Mb Class I (B1) 4°C	0.5 M phosphate disodique 0.5 M phosphate dipotassique 0.1 M phosphate di-ammonium 0.1 M Tris-HCl pH 8.5		
Mb Class II (A3) 20°C	2 M phosphate d'ammonium 0.1 M Tris pH 8.5		
Mb Class II (A9) 20°C	2.5 M sulfate d'ammonium 0.1 M Mes pH 6.5		
Mb Class II (A10) 20°C	2.5 M sulfate d'ammonium 0.1 M Hepes NaOH pH 7.5		

Mb Class II (A11) 20°C	2% PEG 400 2 M sulfate d'ammonium 0.1 M Hepes NaOH pH 7.5		
MPD (A3) 20°C	40% MPD 0.2 M fluorure d'ammonium		
MPD (A11) 20°C	40% MPD 0.2 M iodure de potassium		
MPD (A12) 20°C	40% MPD 0.2 M iodure d'ammonium		
MPD (D8) 20°C	40% MPD 0.2 M phosphate di-ammonium		
MPD (H2) 20°C	30% MPD 0.5 M sulfate d'ammonium 0.1 M Hepes NaOH pH 7.5		
JCSG (H12) 20°C	45% MPD 0.2 M ammonium acétate 0.1 M Hepes pH 7.5		

PEG I (G8) 20°C	20% PEG 3350 0.2 M sulfate de magnésium		
PEG II (A11) 20°C	30% PEG 400 0.2 M chlorure de magnésium 0.1 M Hepes pH 7.5		
PEG II (F3) 20°C	Bicelles 20% PEG 4000 10% isopropanol 0.1 M Hepes pH 7.5		
PEG I (H6) 20°C	Bicelles 8% PEG 8000 0.1 M Tris pH 8.5		

**Tableau 15. Conditions de cristallisation obtenues pour BmrA E504A purifié en  $\beta$ -DDM.**

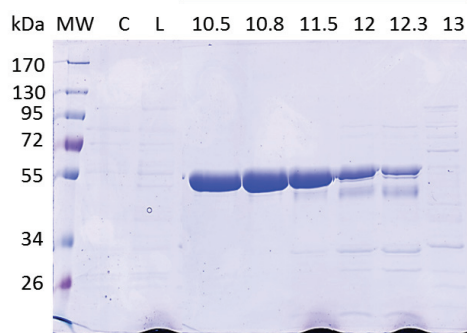
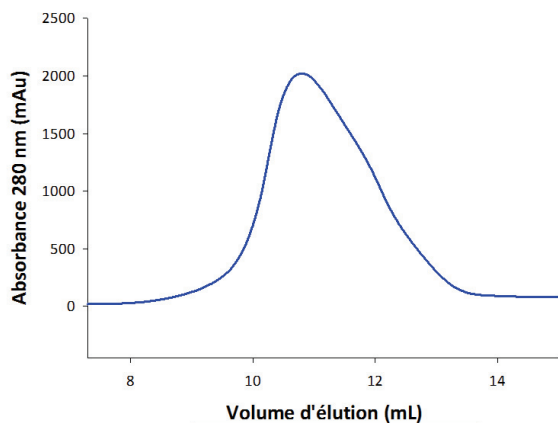
### Purification et cristallisation de BmrA E504A en LMNG

Etant donné que les détergents constituent un facteur clé dans la cristallisation des protéines membranaires, nous avons testé un autre détergent, le LMNG. Comme nous l'avons vu précédemment il est très efficace pour purifier BmrA. Il a également été utilisé avec succès pour résoudre les structures cristallographiques de récepteurs couplé aux protéines G (GPCRs) (Rasmussen et *al.*, 2011; White et *al.*, 2012; Haga et *al.*, 2012; Granier et *al.*, 2012; Manglik et *al.*, 2012). Il a été montré que ce détergent augmente la stabilité de différentes classes de protéines membranaires (les GPCRs, MelB un symporteur  $\text{Na}^+$ /melibiose d'*E. coli*, le transporteur de leucine LeuT et la succinate deshydrogénase d'*E. coli*) par rapport aux détergents classiques comme le DDM ou l'OG (Chae et *al.*, 2010).

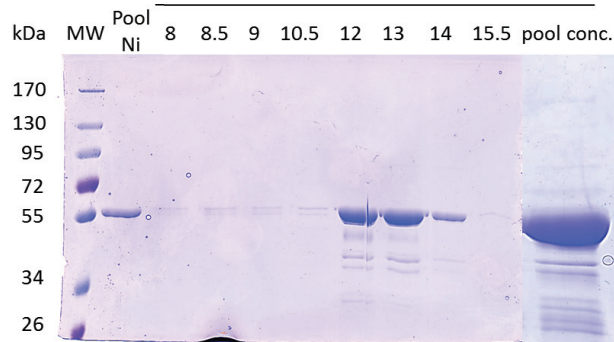
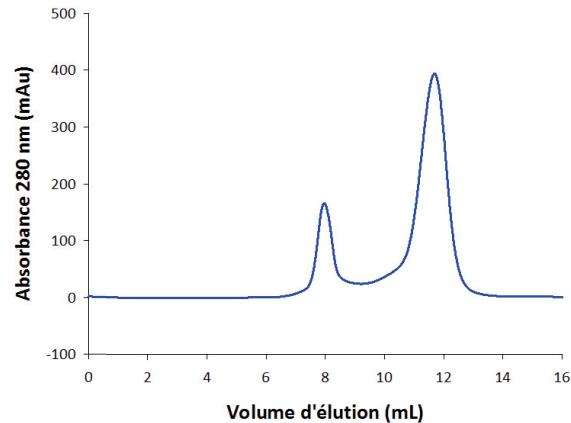
Le surnageant issu d'une solubilisation à 1% de LMNG est chargé sur une résine de nickel-agarose. Le pic d'élution présente un léger épaulement aux alentours de 12 ml par rapport à celui obtenu en DDM (figure 70a). Le dépôt des fractions éluées sur gel SDS-PAGE 10% montre la présence de quelques bandes contaminantes en dessous de 55 kDa. Les frac-

tions correspondant à un volume d'élution compris entre 10 et 11.5 ml ont été rassemblées et chargées sur une colonne d'exclusion Superdex 200.

**a) Chromatographie d'affinité sur colonne de nickel**



**b) Chromatographie d'exclusion-diffusion**



**Figure 70 : Purification de BmrA E504A en LMNG.**

A) Profil d'élution de la chromatographie d'affinité sur nickel agarose et gel SDS-PAGE 10% correspondant. B) Chromatogramme et gel SDS-PAGE 10% des fractions du pic principal obtenus lors de la chromatographie d'exclusion diffusion.

Le chromatogramme montre un pic d'agrégation à 8 ml plus important que celui obtenu en DDM (figure 70b). BmrA est élué à 12 ml en un pic parfaitement symétrique. Les fractions correspondant à ce pic ont été regroupées et concentrées sur 50 kDa jusqu'à 15 mg/ml. L'échantillon concentré a ensuite été déposé sur gel SDS-PAGE. Le degré final de pureté est moins satisfaisant que celui obtenu précédemment en DDM. On note la présence de bandes aux alentours de 43 et 34 kDa dont l'analyse par LC-MS/MS révèle qu'il s'agit de protéolyse de BmrA.

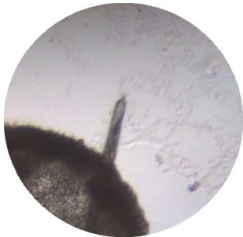
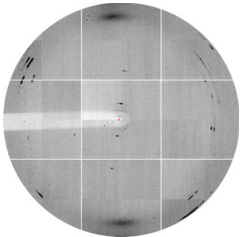
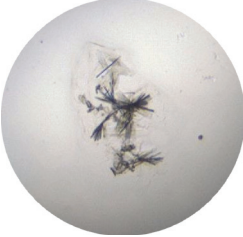
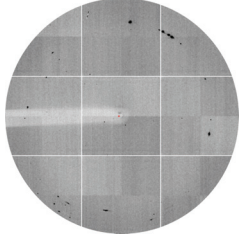

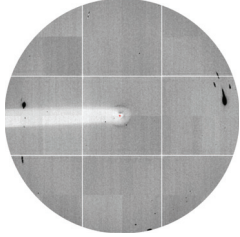
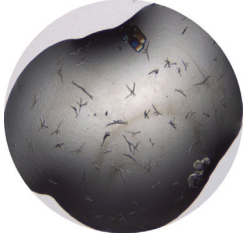
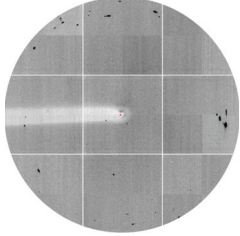
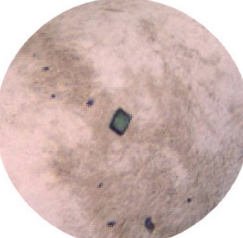
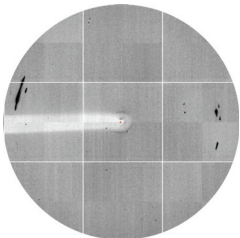
Les essais de cristallisation ont été réalisés à 19°C sur un lot de 10 mg de ce mutant auquel nous avons préalablement ajouté de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (5 mM final), de la doxorubicine (3 mM) ou du GF120918 (2 mM). Un criblage de 1344 conditions de cristallisation a ainsi été réalisé sur BmrA E504A concentré à 5, 10 ou 15 mg/ml en utilisant les kits commerciaux PEG I, II, MPD et JCSG+.

Ces expériences confirment la plupart des observations faites précédemment quant à la solubilité de BmrA E504A en fonction des différents agents de cristallisation. A 5 mg/ml de protéine, la majorité des gouttes sont limpides quel que soit la nature de l'agent précipitant. A 10 et 15 mg/ml, BmrA E504A précipite respectivement à partir de PEG de poids moléculaire supérieur à 1000 Da et 3 000 Da. La co-cristallisation en présence de nucléotides ou substrats induit la précipitation de la protéine dans la majorité des conditions de cristallisation.

Au total, cinq cristaux ont été obtenus à 19°C dans la forme apo. Les détails concernant leur aspect et les conditions de cristallisation sont énumérées dans le tableau 16 ci-dessous. Cinq d'entre eux ont été obtenus en présence de sels d'ammonium et de sodium. Comme pour les essais réalisés en DDM, les clichés de diffraction enregistrés à 0 et 90° sont sans appel. Les taches de diffraction observées à haute résolution indiquent qu'il s'agit de cristaux de sel.

Au final, les essais de cristallisation réalisés sur le mutant E504A en LMNG se montrent assez décevants dans la mesure où nous ne sommes toujours pas parvenus à obtenir de cristal de protéine.



Kit °C	Conditions de cristallisation	Aspect des cristaux 456 µm	Cliché de diffraction
PEG I (H8) 20°C	20% PEG 3350 0.2 M phosphate di-ammonium		
JCSG+ (C5) 20°C	0.8 M Phosphate de sodium 0.1 M Hepes pH 7.5		
JCSG+ (E8) 20°C	0.1 M acétat de sodium pH 4.5 1 M phosphate di-ammonium		
MPD (D8) 20°C	40 % MPD 0.2 M phosphate di-ammonium		
MPD (H2) 20°C	30% MPD 0.5 M sulfate d'ammonium 0.1 M Hepes NaOH pH 7.5		

**Tableau 16. Conditions de cristallisation obtenues pour BmrA E504A en LMNG.**



## Homogénéité des échantillons purifiés en $\beta$ -DDM, LMNG et FC12

Après avoir purifié BmrA E504A en DDM et LMNG, environ 6 000 conditions de cristallisation ont au total été criblées mais aucune n'a abouti à un cristal de protéine. Les deux échantillons purifiés en DDM et LMNG répondent pourtant parfaitement aux trois conditions classiquement requises pour la cristallisation des protéines : au moins 10 mg de BmrA a pu être isolé et concentré jusqu'à 15 mg/ml, le degré final de pureté est presque de 100% pour l'échantillon purifié en DDM et supérieur à 90% pour celui obtenu en LMNG. Les profils d'élution sur gel filtration démontrent une excellente homogénéité et monodispersité au sein des échantillons. La question est donc de savoir pourquoi la protéine BmrA ne cristallise-t-elle pas ?

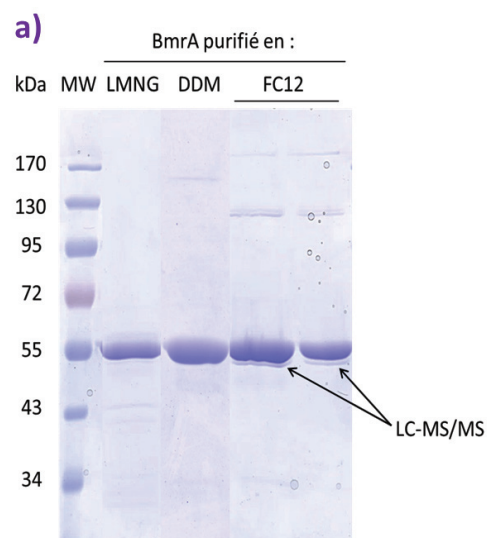
Un premier élément de réponse nous a été fourni par l'analyse de la purification de BmrA en foscholine 12 (Partie I de ce chapitre). Après purification, il a en effet toujours été observé sur gel SDS-PAGE 10% la présence d'une bande située juste en dessous de la bande principale correspondant à BmrA à 55 kDa, comme nous pouvons le voir dans la figure 71a ci-dessous. L'analyse de cette sous-bande par LC-MS/MS révèle sans surprise qu'il s'agit de BmrA. Mais le séquençage détaillé des peptides, présenté dans la figure 71b, montre l'absence de l'hélice N-terminale (neuf résidus) à laquelle est associée l'étiquette hexahistidine.

L'échantillon purifié en FC12 a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF dans le but de vérifier la présence ou non de plusieurs populations de protéine. Le spectre, présenté dans la figure 71c, indique la présence de trois pics aux alentours de 65 kDa et confirme la présence de plusieurs populations de BmrA : le pic majoritaire à 65 490 Da correspond à la masse attendue pour le monomère de BmrA (bande à 55 kDa sur gel SDS-PAGE), le second à 63 872 Da coïncide avec la masse d'un monomère dans lequel l'hélice N-terminale associée au tag hexa-histidine a été clivée (sous-bande à 55 kDa), le troisième à 59 227 Da correspond probablement au monomère dans lequel une cinquantaine de résidus ont été clivés du côté N-terminale (non visible sur gel SDS-PAGE).

La question qui se pose est maintenant de savoir si cette hétérogénéité est également présente au sein des échantillons purifiés en DDM et LMNG, ce qui expliquerait dans ce cas pourquoi BmrA ne cristallise pas. Les fractions purifiées en DDM et LMNG ont été déposées sur gel SDS-PAGE 10% (figure 71a). Contrairement à ce que l'on observait précédemment en foscholine 12, aucune sous-bande à 55 kDa n'est cette fois-ci visible. Nous avons alors analysé ces fractions purifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les spectres en DDM et LMNG, présentés dans la figure 72, sont identiques mais très différents de celui obtenu en foscholine 12. On observe la présence de trois pics : le premier se situe à 65 500 Da, le second à 69 000 Da et le troisième à 72 500 Da. Le pic majoritaire à 65 500 Da correspond à la masse attendue pour le monomère de BmrA. Mais les deux autres en revanche suggèrent que des peptides de respectivement 3 400 Da et 7 000 Da restent associés au monomère de BmrA.

### Figure 71 : Etude de l'homogénéité de BmrA purifié en foscholine 12.

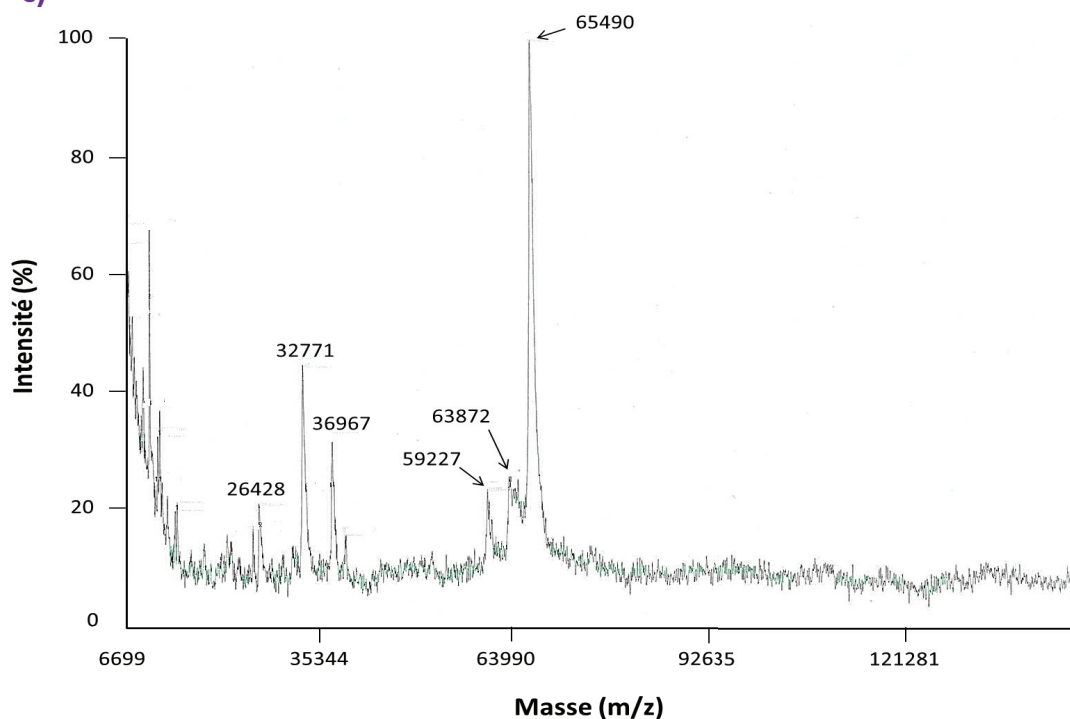
A) Gel SDS-PAGE 10% des échantillons de BmrA purifiés en LMNG (piste 2), DDM (piste 3) et FC12 (pistes 4 et 5). B) Séquençage par LC-MS/MS de la sous-bande située à 55 kDa en FC12. Les peptides colorés en vert sont identifiés avec certitude et ceux en jaune avec 50% d'incertitude. Le peptide coloré en rouge correspond à l'hélice N-terminale de BmrA qui est non identifié. C) Spectre MALDI-TOF de l'échantillon de BmrA purifié en FC12.

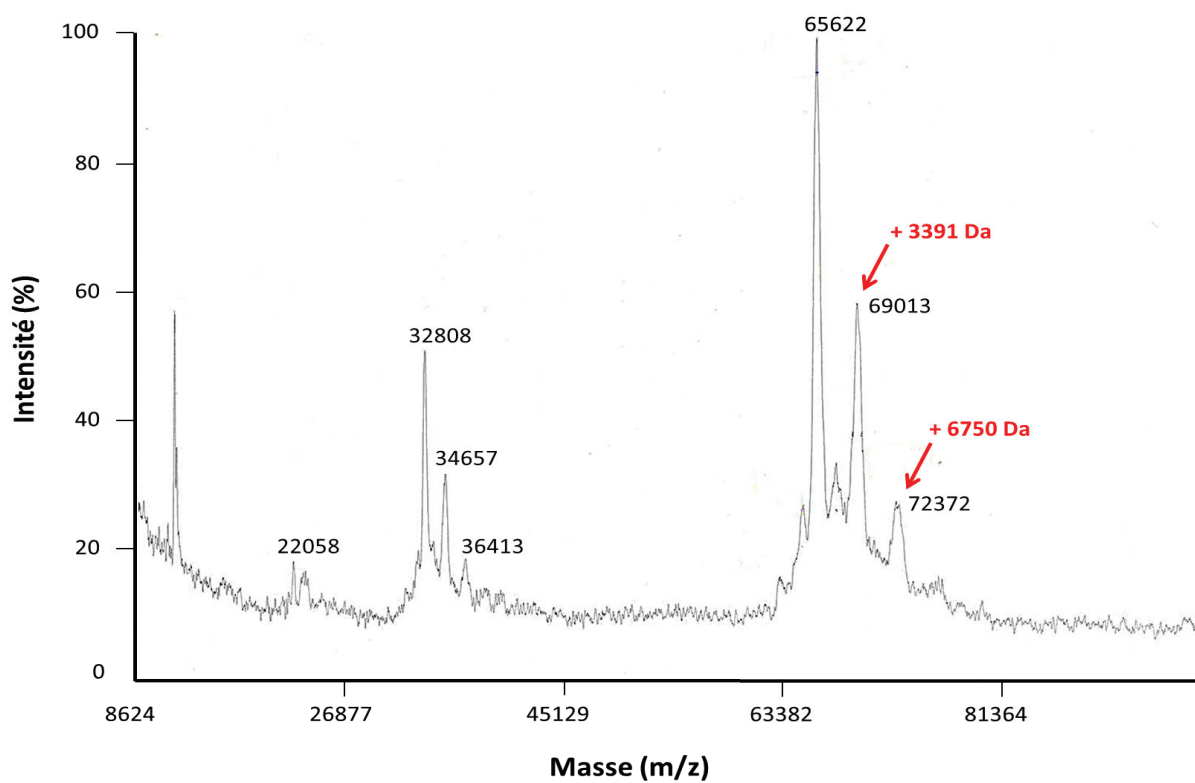
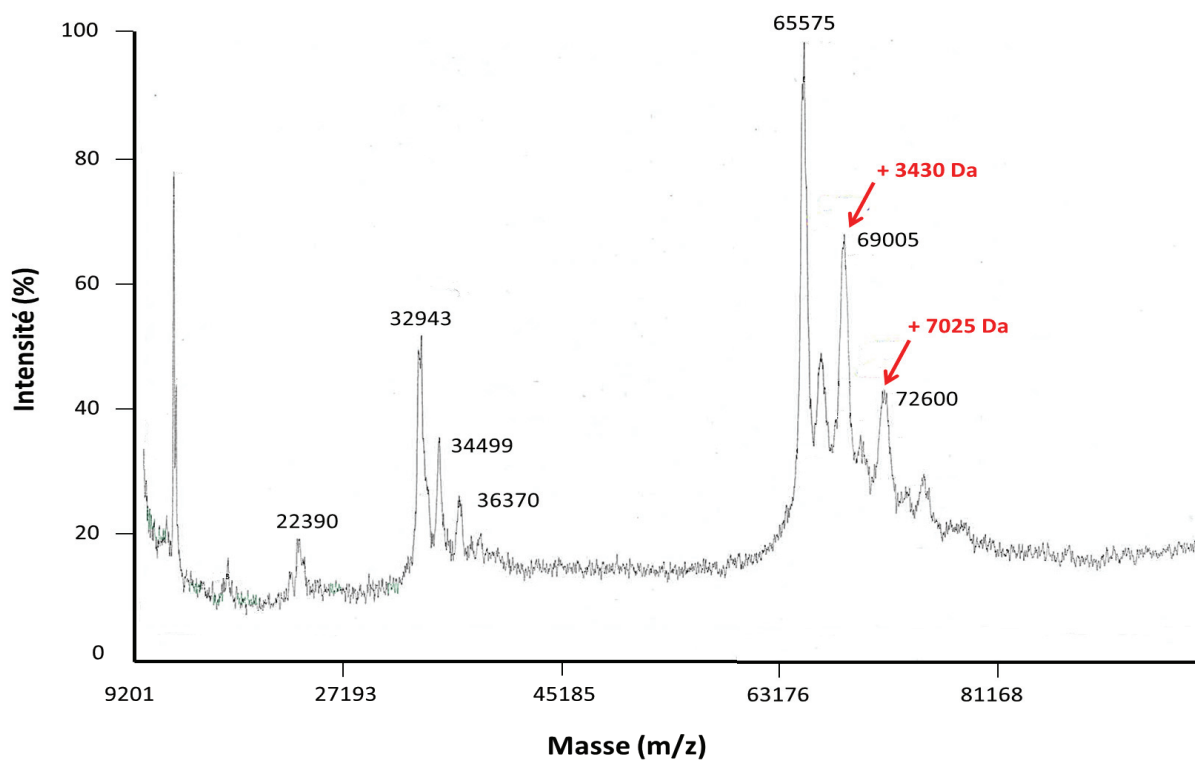


b)

N-ter	MPTKKQKSKS	KLKPFALVR	RTNPSYGKLA	FALALSVTT	LVSLLIPLLT	KQLVDGFSMS	NLSGTQIGLI	ALVFFVQAGL
	SAYATYALNY	NGQKIISGLR	ELLWKLIKL	PVSFYDTNAS	GETVSRVTND	TMVVKELITT	HISGFITGII	SVIGSLTILF
	IMNWKLTLLV	LVVVPLAALI	LVPIGRKMFS	ISRETDQETA	RFTGLNQIL	PEIRLVKASN	AEDVEYGRGK	MGISSLFKLG
	VREAKVQSLV	GPLISLVIMA	ALVAVIGYGG	MQVSSGELTA	GALVAFILYL	FQIIMPMGQI	TTFTQLQKS	IGATERMIEL
	LAEEEEDTVY	GKQIENAHLP	QLDRVSFGY	KPDQLILKEV	SAVIEAGKVT	AIVGPSGGGK	TTLFKLLERF	YSPTAGTIRL
	GDEPVDYSL	ESWREHIGYV	SQESPLMSGT	IRENICYGLE	RDVTDAEIEK	AAEMAYALNF	IKELPNQFDI	EVGERGIMLS
	GGQRQRIATA	RALLRNPSIL	MILDATSSLD	SQSEKSVQQA	LEVLMEGRIT	IVIAHRLSTV	VDADQLLFVE	KGEITGRGTH
	HELMASHGLY	RDFAEQQLKM	NADLENKAG	C-ter				

c)



**a) DDM****b) LMNG**

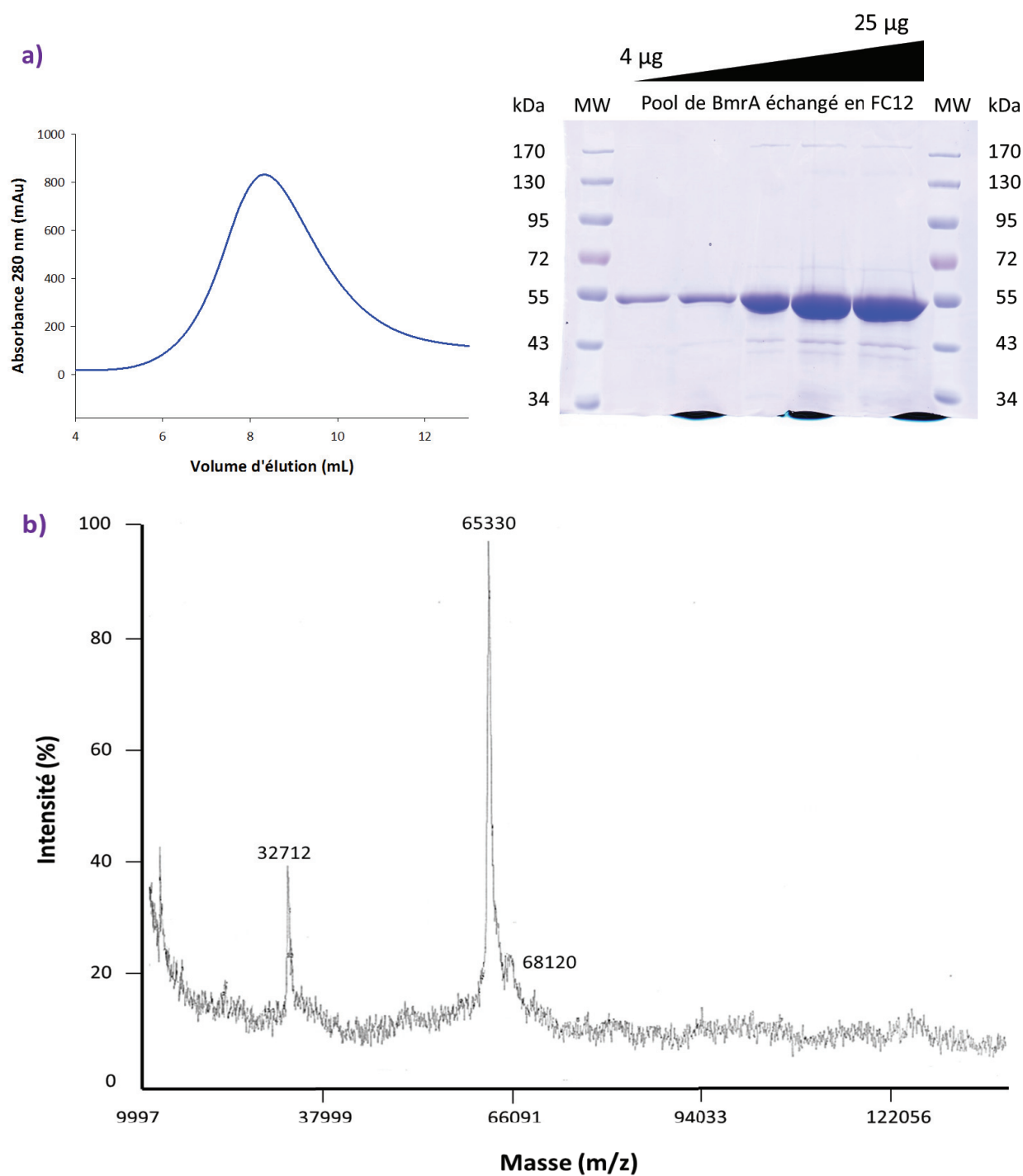
**Figure 72 : Spectres MALDI-TOF de BmrA E504A purifié en DDM et LMNG.**

Il est important de remarquer que ces deux adduits ne sont pas observés sur le spectre MALDI-TOF de l'échantillon de BmrA purifié en FC12. Nous avons donc souhaité déterminer si l'interaction entre ces peptides et BmrA purifié en DDM et LMNG était covalente ou non et si tel était le cas nous pouvions les éliminer en échangeant le détergent maltoside sur colonne d'affinité au nickel contre la foscholine 12.

BmrA E504A est solubilisé avec 1% de LMNG puis le surnageant est chargé sur colonne d'affinité au nickel. Après fixation des protéines, un premier lavage est effectué avec cinq volumes de tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol, 20 mM imidazole, 1 mM PMSF et 0,05% LMNG. Le détergent est ensuite échangé sur vingt volumes de colonne avec le même tampon contenant 0.03% de FC12. BmrA est élué dans un tampon constitué de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol, 250 mM imidazole, 1 mM PMSF et 0.03% FC12. Le profil d'élution est présenté dans la figure 73a. Les fractions correspondant à ce pic ont été regroupées et des quantités croissantes de BmrA purifié ont été déposées sur gel SDS-PAGE 10% (figure 73b). BmrA est purifié très efficacement et l'on peut noter l'absence de la sous-bande à 55 kDa.

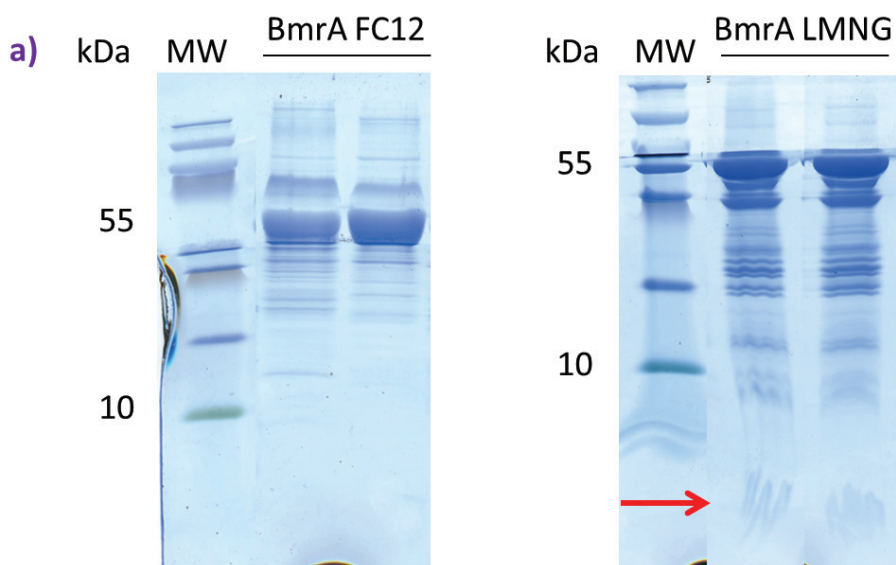
L'échantillon de BmrA échangé en FC12 a été analysé en spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le spectre, présenté dans la figure 73b, indique la présence d'un seul pic à 65 330 Da et l'absence des deux adduits. L'interaction de ces peptides avec BmrA purifié en DDM et LMNG n'est donc pas covalente mais suffisamment forte pour résister à la désorption-ionisation laser du Maldi.

L'autre question que l'on est en droit de se poser concerne la nature de ces deux adduits. Pour y répondre, nous avons déposé les fractions purifiées en FC12 et LMNG sur gel tricine SDS-PAGE 16%. Ce type de gel devrait en théorie nous permettre de séparer les adduits du monomère de BmrA. Les deux gels obtenus sont présentés dans la figure 74a. On distingue clairement dans la fraction purifiée en LMNG la présence d'une bande aux alentours de 4 kDa, qui est absente dans l'échantillon purifié en FC12. L'analyse de cette bande par LC-MS/MS indique de manière surprenante qu'il s'agit de BmrA. Le séquençage obtenu est présenté dans la figure 74b et identifie la présence de deux peptides au niveau des domaines nucléotidiques de BmrA, ce qui semble à priori très peu crédible.



**Figure 73 : BmrA extrait en LMNG est échangé en FC12 sur colonne d'affinité au nickel.**

A) Profil d'éluion et gel SDS-PAGE 10% correspondant à l'échange du LMNG en FC12 sur colonne d'affinité au nickel. B) Spectre MALDI-TOF de BmrA échangé en foscholine 12.



b)

Bande	Score	Peptides	Couverture de séquence (%)	MW (kDa)	Acides aminés	Code accession	Nom
4 kDa	288.3	6	7,30	64.5	589	O06967	Multidrug resistance ABC transporter ATP-binding protein BmrA
MPTKKQKSKS KLPFFALVR RTNPSYGKLA FALALSVVTT LVSLLIPLLT KQLVDGFSMS NLSGTQIGLI ALVFFVQAGL SAYATYALNY NGQKIISGLR ELLWKKLIK PVSYFDTNAS GETVSRVTND TMVVKELITT HISGFITGII SVIGSLTILF IMNWKLTLV LVVPLAALI LVPIGRKMFS ISRETQDETA RFTGLLNQIL PEIRLVKASN AEDVEYGRGK MGISSLFKLG VREAKVQSLV GPLISLVLMA ALVAVIGYGG MQVSSGELTA GALVAFILYL FQIIMPMGQI TTFTTQLQKS IGATERMIEI LAAAAEDTVT GKQIENALHP IQLDRVSFGY KPDQLILK <b>EV SAVIEAGKVT AIVGPSGGGK</b> TTLFKLLERF YSPTAGTIRL GDEPVDYSL ESWREHIGYV SQESPLMSGT IRENICYGLE RDVTDAEIEK AAEMAYALNF IKELPNQFDT EVGERGIMLS GGQRQRIAIA RALLRNPSIL MLDEATSSLD SQSEK <b>SVQQA LEVLMEGRIT IVIAHRLSTV</b> VDADQLLFVE KGEITGRGTH HELMASHGLY RDFAEQQLKM NADLENKAG							

**Figure 74 : Identification des adduits purifiés en LMNG et DDM.**

A) Gel tricine SDS-PAGE 16% des échantillons de BmrA purifiés en FC12 et LMNG. B) Séquençage par LC-MS/MS de la bande à 4 kDa indiquée par une flèche rouge sur le gel de droite. Les peptides colorés en vert sont identifiés avec certitude.

## C. DISCUSSION

L'utilisation combinée de la souche C43(DE3)  $\Delta$ *acrB* d'*E. coli* et du mutant inactif E504A nous a permis de produire et purifier en DDM et LMNG des quantités très importantes de BmrA (dix milligrammes pour deux litres de culture) avec un degré final de pureté proche de 100%. Nous avons ainsi pu tester près de 6 000 conditions de cristallisation, incluant des essais à 4°C et 19°C, en bicelles et de co-cristallisation avec des substrats comme la doxorubicine, des nucléotides (ATP-Mg<sup>2+</sup>), et des inhibiteurs (GF120918) censés stabiliser les parties supposées plus flexibles et faciliter ainsi la cristallisation. Ces essais se sont révélés assez décevants dans la mesure où sur les vingt cinq cristaux obtenus, tous correspondaient à des cristaux de sel.



Avant de relancer le criblage de nouvelles conditions de cristallisation avec des échantillons de BmrA purifiés dans d'autres détergents, nous avons voulu comprendre pourquoi cette protéine se révèle si difficile à cristalliser.

Pour BmrA sauvage, l'explication vient du fait que la protéine est naturellement flexible et très instable en solution. Elle a pu être concentrée jusqu'à 5 mg/ml mais au-delà, 80% de BmrA s'agrège lors de cette étape malgré la quantité confortable de détergent. L'incubation de la protéine avec des substrats ne stabilise pas non plus le transporteur étant donné la forte précipitation des gouttes de cristallisation. Il apparaît dans ces conditions impossible de cristalliser BmrA sauvage. La question est de savoir pourquoi la protéine s'agrège autant lors de la concentration après gel filtration. Durant la chromatographie d'affinité, BmrA est éluée dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol, 250 mM imidazole, 1 mM PMSF et DDM 0,07%. L'échantillon est ensuite concentré jusqu'à 500 µl puis injecté sur une colonne Superdex 200, préalablement équilibrée avec un tampon constitué de 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, et 0,03% DDM. Comme nous l'avons vu précédemment, le chromatogramme de gel filtration montre un pic d'agrégation à 8 ml qui est très minoritaire, ce n'est qu'après lors de la concentration que la protéine s'agrège. Ceci suggère que le tampon influence grandement la stabilité de la protéine sauvage en solution. Plusieurs exemples tirés de la littérature montrent que le simple fait de changer d'agent tampon, de pH ou d'augmenter la force ionique permet de purifier une protéine plus stable et homogène (Mavaro et *al.* 2011; Sala et de Marco, 2010; Collins, Stevens et *al.*, 2005; Zaitseva, Holland et *al.*, 2004). En optimisant la composition du tampon de purification, Schwarz et Tschapek sont parvenus à obtenir la protéine HlyB, un transporteur ABC de l'hémolysine chez *E. coli*, stable à 100 mg/ml pendant plusieurs semaines alors qu'au départ la protéine s'agréait au dessus de 3 mg/ml (Schwarz, Tschapek et *al.*, 2011). Des kits commerciaux (Hampton Research, Molecular Dimensions, Qiagen) permettent aujourd'hui de cribler différents agents tampon, concentrations en sels et additifs dans le but de déterminer le tampon idéal dans lequel la protéine est la plus soluble. Pour parvenir à concentrer puis par la suite cristalliser BmrA sauvage, Il apparaît ainsi primordial de passer du temps à optimiser la composition du tampon de gel filtration.

Nous avons fort heureusement réussi à obtenir de grandes quantités de BmrA en utilisant le mutant inactif E504A, beaucoup plus soluble que la protéine sauvage. Mais comme nous l'avons vu précédemment, aucun cristal de protéine n'a été obtenu malgré moult tentatives. Les échantillons purifiés en FC12, DDM et LMNG sont hétérogènes, ce qui semble expliquer pourquoi BmrA ne cristallise pas.

En FC12, la partie N-terminale de BmrA à laquelle est associée l'étiquette hexahistidine est très flexible et particulièrement sensible à la protéolyse, ce qui entraîne la présence de trois populations de protéine au sein de l'échantillon : une première, très majoritaire, correspond à l'homodimère de BmrA qui est intact, une seconde correspond à l'homodimère dans lequel l'hélice N-terminale de l'un des deux monomères a été clivée et enfin une troisième correspond à l'homodimère dans lequel une cinquantaine de résidus de l'un des deux monomères a été clivée.

En DDM et LMNG, on observe également la présence de trois populations différentes de protéine : l'une correspond à l'homodimère attendu de BmrA et deux autres correspondent à l'homodimère auquel est associé deux adduits de respectivement 3 400 et 7 000 Da. Nous avons montré que cette interaction n'est pas covalente puisque nous pouvons éliminer les adduits en échangeant le détergent contre la foscholine 12. Cette interaction est néanmoins très forte, probablement de nature hydrophobe, car les adduits résistent à la désorption-ionisation laser du MALDI. L'interrogation principale qui subsiste concerne la nature de ces objets. Il ne peut pas s'agir de molécules de sucres étant donné que la bactérie *E. coli* n'effectue pas de modifications post-traductionnelles. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la structure du transporteur ABC humain ABCB10 a été résolue en complexe avec deux molécules de cardiolipine. Peut-il donc s'agir également dans notre cas de molécules de lipides qui interagissent avec BmrA ? *E. coli* est composée de trois glycérophospholipides principaux (Garrett et *al.*, 2009) : la cardiolipine (1466 Da), la phosphatidyléthanolamine ( $\approx$  686-777 Da) et le phosphatidylglycérol ( $\approx$  685 Da). En imaginant par exemple que cinq molécules de phosphatidylglycérol interagissent avec BmrA, ceci correspondrait à un adduit de 3430 Da, ce qui est accord avec ce que l'on observe. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions extraire BmrA en LMNG et échanger sur colonne d'affinité au nickel le détergent contre la foscholine 12 comme nous l'avons fait précédemment. Mais il serait ensuite intéressant de conserver la fraction non retenue lors de l'échange (échantillon sans protéine) et de l'analyser par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour détecter la présence d'éventuels lipides. Une autre hypothèse pourrait être que BmrA interagit avec une petite protéine d'*E. coli*. Tornroth-Horsefield et *al.*, ont par exemple résolu la structure du transporteur AcrB en complexe avec une hélice transmembranaire de 11 kDa (Tornroth-Horsefield et *al.*, 2007). L'analyse par spectrométrie de masse a révélé qu'il s'agissait de la protéine YajC dont la fonction reste encore inconnue (Fang et Wei, 2011).

L'hétérogénéité de population au sein des échantillons purifiés pourrait expliquer pourquoi BmrA ne cristallise pas. Il serait donc intéressant de soumettre BmrA à une protéolyse limitée afin d'isoler une seule population stable de la protéine qui soit favorable à la cristallisation. Ceci permettrait d'éliminer les régions flexibles comme la partie N-terminale ou les adduits qui empêchent la formation de contacts entre protéine. Une étude a été réalisée par Wernimont et Edwards sur 270 protéines solubles récalcitrantes à la cristallisation. Ils sont parvenus après protéolyse limitée à résoudre la structure de 34 de ces protéines soit un taux de succès de 12.6% (Wernimont et Edwards, 2009).

### **III. ESSAIS DE CRISTALLISATION SUR BMR A E504A PURIFIÉ DANS DES MICELLES MIXTES DE B-DDM ET SODIUM CHOLATE.**

Les résultats décrits dans la partie précédente nous ont montré que maintenir le même type de détergent tout au long du processus d'extraction, purification et cristallisation n'était pas efficace pour parvenir à cristalliser BmrA. Nous avons donc décidé de revoir complètement notre stratégie de purification en sélectionnant un détergent spécifique et adapté à chaque étape. Nous nous sommes ainsi inspirés des protocoles de purification de P-gp de *Mus musculus* et *Cyanidioschyzon merolae* pour lesquels le transporteur est d'abord extrait avec un détergent possédant une longue chaîne aliphatique comme le triton X-100 pour ensuite être échangé contre une micelle mixte de DDM-sodium cholate, de petite taille, censée favoriser les contacts protéine-protéine. Grâce à ce nouveau protocole, nous avons pu purifier des quantités importantes de BmrA E504A. L'échantillon obtenu présente une très grande pureté (>99%) et une grande homogénéité. Considérant ces résultats encourageants, nous avons relancé un criblage de nouvelles conditions de cristallisation, qui cette fois-ci sont apparues très prometteuses. La troisième partie de l'étude structurale de BmrA sera donc consacrée à l'optimisation de ces conditions de cristallisation afin d'obtenir des cristaux de qualité, diffractant correctement les rayons X.

L'ensemble de ce travail est présenté dans le chapitre ci-après. Nous reviendrons dans un premier temps sur le nouveau protocole de purification de BmrA qui a été mis en place, détaillerons les principaux résultats obtenus et enfin discuterons des perspectives envisagées pour améliorer la qualité de diffraction des cristaux de BmrA.

#### **A. MATERIEL ET METHODES**

##### **Sur-expression et préparation des membranes de BmrA E504A**

La protéine BmrA E504A a été surexprimée dans la souche C43(DE3)  $\Delta acrB$  d'*Escherichia coli* pendant sept heures à 23°C après induction avec 0.7 mM IPTG final. Le protocole détaillé d'expression et de préparation des membranes de BmrA est le même que celui décrit dans la partie matériel et méthodes du chapitre précédent.

##### **Purification de BmrA E504A en DDM-sodium cholate**

La préparation membranaire est rapidement décongelée dans un bécher d'eau chaude puis placée dans la glace. Les membranes sont diluées à 5 mg de protéines/ml dans le tampon de solubilisation (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol et pastilles anti-protéases). BmrA est ensuite extrait avec 4.5% (v/v) de triton X-100 (Sigma<sup>6</sup>). Les membranes sont solubilisées pendant 2 heures à 4°C sur roue. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation à 100000xg pendant 40 minutes à 4°C. BmrA extrait est ensuite purifié par

---

<sup>6</sup> Référence du produit : T9284-100ML

deux passages successifs sur colonne d'affinité au nickel et une dernière étape de chromatographie d'exclusion diffusion.

Une colonne  $\text{Ni}^{2+}$  HiTrap Chelating de 5 ml (*GE Healthcare*) est équilibrée avec cinq volumes de tampon composé de 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% glycérol, 4,5% triton, 0,04% sodium cholate, 20 mM imidazole et pastilles anti-protéases. Les protéines solubilisées sont ensuite chargées à 2 ml/min et la résine est lavée avec dix volumes de tampon 20 mM Hepes NaOH pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,04% sodium cholate, 0,0675%  $\beta$ -DDM, 20 mM imidazole et pastilles anti-protéase. L'élution est réalisée avec le tampon 20 mM Hepes NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,04% sodium cholate, 0,0675%  $\beta$ -DDM, 200 mM imidazole et pastilles anti-protéase. La protéine est collectée par fractions de 500  $\mu\text{l}$ . Celles correspondant au pic d'élution sont ensuite rassemblées et le surnageant est dilué dix fois dans le tampon 20 mM Hepes NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,04% sodium cholate et 0,0675%  $\beta$ -DDM.

La solution est chargée une seconde fois sur colonne  $\text{Ni}^{2+}$  Hitrap Chelating de 5 ml, auparavant régénérée en nickel puis équilibrée avec cinq volumes de tampon 20 mM Hepes NaOH pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,0675%  $\beta$ -DDM, 0,04% sodium cholate, 20 mM imidazole et pastilles anti-protéases. La résine est ensuite lavée avec dix volumes de tampon 20 mM Hepes NaOH pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,04% sodium cholate, 0,0675%  $\beta$ -DDM, 20 mM imidazole et pastilles anti-protéase. L'élution est réalisée avec le tampon 20 mM Hepes NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,04% sodium cholate, 0,0675%  $\beta$ -DDM, 200 mM imidazole et pastilles anti-protéase. Les protéines sont collectées par fractions de 500  $\mu\text{l}$ .

Les fractions correspondant au pic d'élution sont rassemblées et l'échantillon est concentré grâce à un système amicon ultra (Millipore) d'un volume total de 15 ml et possédant un seuil de coupure de 50 kDa. La protéine est déposée puis centrifugée à 4°C à 5 000xg jusqu'à atteindre un volume de 500  $\mu\text{l}$ . L'échantillon concentré est ensuite injecté sur colonne d'exclusion Superdex 200 préalablement équilibrée avec deux volumes de tampon 20 mM Hepes NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,01% sodium cholate et 0,035%  $\beta$ -DDM. La protéine BmrA E504A est recueillie par fractions de 500  $\mu\text{l}$  et les fractions correspondant au pic d'élution aux alentours de 12 ml sont rassemblées. Le pool dilué est conservé à 4°C jusqu'à la réalisation des expériences de cristallogenèse.

Les méthodes d'analyse de la protéine (électrophorèse, détermination de la concentration de la protéine...) qui ont été utilisées sont les mêmes que celles décrites dans le chapitre précédent.

## Cristallogenèse

Les essais de cristallisation ont été réalisés suivant le principe de la diffusion de vapeur et la technique de la goutte suspendue, en boîtes 96 puits et grâce au robot Mosquito de la plateforme de cristallogenèse de l'IBCP.

Le criblage des nouvelles conditions de cristallisation a été réalisé à l'aide des kits commerciaux PEGs I et II. Nous avons testé différentes concentrations en protéine (5, 10 et

15 mg/ml) et fait varier le ratio protéine/précipitant. L'ensemble des essais qui ont été réalisés est détaillé dans le tableau 17 ci-dessous :

Kit	Conformation	Ratio Prot./Préc.	[BmrA] (mg/ml)	Température
PEG I	Apo	1:1	10	4°C
			15	
		2:1	5	
			10	
PEG II	Apo	1:1	10	4°C
		2:1	15	

**Tableau 17. Criblage des conditions de cristallisation réalisées avec BmrA E504 en DDM-sodium cholate.**

Pour obtenir des gouttes avec un ratio protéine/ précipitant 1:1, 250 nl de solution protéique a été mélangé avec le même volume de solution de cristallisation. Pour obtenir le ratio 2:1, 333 nl de solution protéique a été mélangé avec 167 nl de solution de cristallisation. Ces gouttes ont ensuite été mises à équilibrer contre un réservoir de 100 µl à 4°C.

### Optimisation des conditions de cristallisation

Un premier criblage des conditions de nucléation, réalisé à l'aide des kits commerciaux PEGs Suite 1 et 2 (voir ci-dessus), a conduit à la formation de germes cristallins. Notre travail a donc consisté à optimiser ces microcristaux afin de diminuer la nucléation et obtenir des monocristaux de taille et de qualité de diffraction suffisantes. A partir de la condition de départ :

(I) 38-40% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0, [BmrA] = 7 mg/ml, ratio 2:1 à 4°C.

Nous avons testé dans des boîtes 96 puits chaque paramètre physicochimique indépendamment :

- ⊕ La température : les boîtes ont été mises à équilibrer à 4°C, 12°C et 19°C
- ⊕ La concentration de BmrA que nous avons fait varier entre 5, 7, 10 et 15 mg/ml
- ⊕ La nature du sel (NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaI, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na, NaF, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- ⊕ La nature et la concentration du polyéthylène glycol (200, 300, 400, 550 MME, 600)
- ⊕ La concentration en chlorure de potassium (0,1, 0,2, 0,3 et 0,4 M)
- ⊕ Le pH : les expériences ont été réalisées entre pH 6,0 et 7,5 par incrément de 0,2
- ⊕ Le ratio protéine/précipitant : 1,5:1; 2:1; 2,5:1 et 3:1
- ⊕ L'ajout d'additifs grâce au kit « Additive Screen » d'Hampton Research
- ⊕ L'ajout de détergent avec le kit « Detergent Screen » d'Hampton Research

- ⊕ La co-cristallisation avec des substrats (doxorubicine 0,5 et 1 mM ; daunorubicine 200  $\mu$ M ; hoechst 33342 500  $\mu$ M ; rhodamine 1 mM), des inhibiteurs (GF120918X 2 mM ; LY335579 500  $\mu$ M ; QZ59 R et S 500  $\mu$ M) ou des analogues d'ATP non hydrolysables (AMP-PNP 5 mM)
- ⊕ La croissance cristalline en procédant à des micro-ensemencements

### La technique d'ensemencement (théorie en annexe)

Nous avons utilisé la technique du micro-ensemencement pour nous affranchir de l'étape de nucléation et nous focaliser sur la croissance des cristaux.

Des cristaux petits ou de mauvaise qualité sont pêchés dans une goutte et déposés dans 20  $\mu$ l de la solution réservoir. Le mélange est déposé dans un tube contenant une bille d'ensemencement (Hampton Research) et 50  $\mu$ l de la solution réservoir. Les cristaux sont broyés en agitant vigoureusement le tube au vortex pendant une minute. On rajoute 400  $\mu$ l de la solution réservoir pour obtenir une solution stock d'ensemencement à 100%. On peut maîtriser le nombre de germes à ensemercer en diluant la solution stock par 2 ou 5 (avec la solution du puits) et ainsi obtenir des solutions d'ensemencement à 50% et 20%. On peut alors favoriser la croissance de grands cristaux (solution d'ensemencement à 20%) au lieu d'une multitude de petits (solution à 100%). Les essais ont été réalisés avec la technique de la goutte suspendue en ajoutant la solution d'ensemencement à 10% final.

### Optimisation des conditions de purification

Afin d'obtenir des cristaux de taille et de qualité de diffraction satisfaisantes, nous sommes également intervenus sur la purification de BmrA. Nous avons purifié la protéine dans six conditions différentes. Les détergents et les concentrations utilisées à chaque étape sont détaillés dans le tableau 18 ci-dessous. Tous les échantillons ont ensuite été concentrés jusqu'à 15 mg/ml et nous avons réalisés des essais de cristallisation autour de la condition (V) : BmrA 7 mg/ml, ratio protéine/précipitant 2:1, 35-45% PEG 200, 0,1 M Pipes NaOH pH 7,0 et 0,3M KCl à 4°C.

Extraction	Triton X-100 4,5%				$\beta$ -DDM 1%	
Ni-NTA (1)	DDM-cholate 0,0675%-0,04%	LMNG-cholate 0,3%-0,1%	DDM-chaps 0,0675%-0,04%	DDM 0,07%	DDM-cholate 0,0675%-0,04%	DDM 0,07%
Ni-NTA (2)	DDM-cholate 0,0675%-0,04%	LMNG-cholate 0,1%-0,1%	DDM-chaps 0,0675%-0,04%	DDM 0,07%	DDM-cholate 0,0675%-0,04%	DDM 0,07%
Gel filtration	DDM-cholate 0,035%-0,01%	LMNG-cholate 0,003%-0,1%	DDM-chaps 0,035%-0,01%	DDM 0,03%	DDM-cholate 0,035%-0,01%	DDM 0,03%
Cristallisation	BmrA 7 mg/ml, ratio 2:1, 35-45% PEG 200, 0.1M Pipes NaOH pH 7.0 et 0.3M KCl à 4°C.					

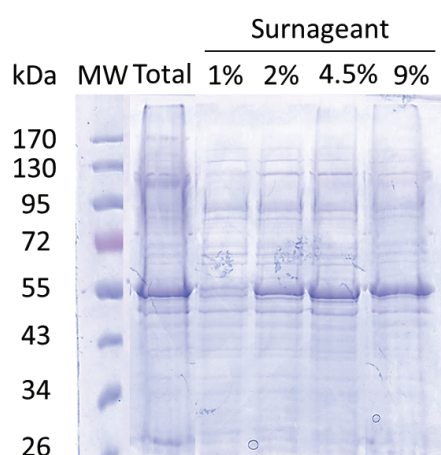
**Tableau 18. Essais de cristallisation réalisés avec BmrA E504A purifié dans différentes conditions.**



## B. RESULTATS

### Purification et cristallisation de BmrA E504A en $\beta$ -DDM-sodium cholate

Nous avons surproduit BmrA E504A dans la souche C43(DE3) d'*Escherichia coli* pendant sept heures à 23°C comme décrit dans la partie matériel et méthode du chapitre précédent. BmrA a ensuite été extrait des membranes en présence de 4,5% de triton X-100. Nous avons optimisé l'efficacité d'extraction de BmrA sur gel SDS-PAGE 10% en testant différentes concentrations de triton (figure 75). A 4,5%, ce détergent est efficace à environ 75% pour extraire BmrA.



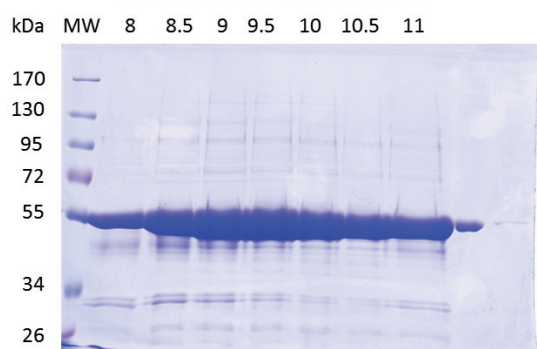
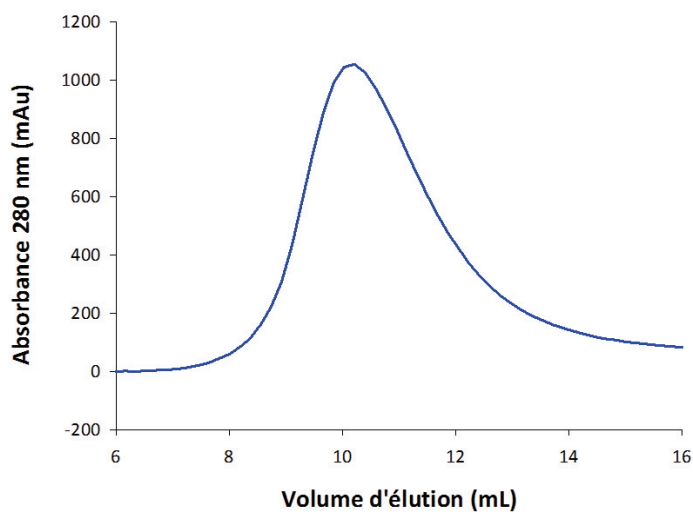
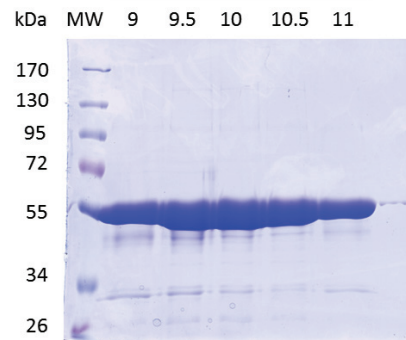
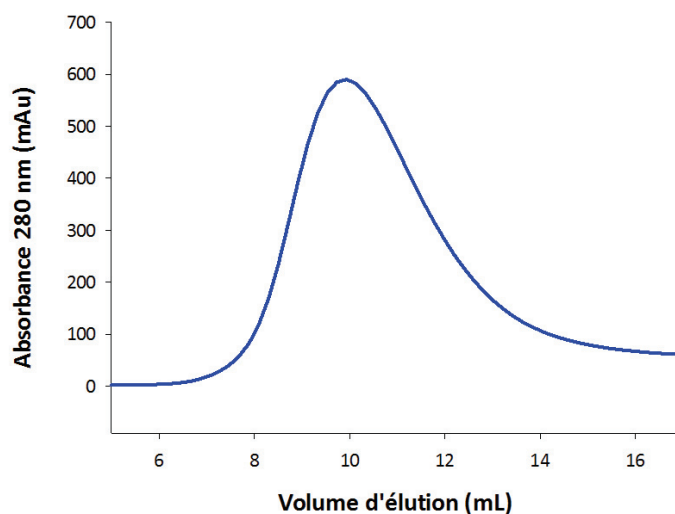
**Figure 75 : Optimisation de l'extraction de BmrA E504A en triton X-100.**

Les membranes, diluées à 5 mg de protéines/ml, sont incubées avec 1, 2, 4,5 et 9% de triton X-100 pendant 2 heures à 4°C sur agitation. Après centrifugation à 100000xg pendant 40 minutes, 12  $\mu$ l de surnageant contenant les protéines solubilisées est déposé sur gel SDS-PAGE 10%.

Le surnageant contenant les protéines solubilisées est chargé sur une colonne de nickel agarose préalablement équilibrée avec 4,5% de triton. Une fois les protéines fixées sur la résine, le détergent est échangé sur vingt volumes de colonne contre 0,0675%  $\beta$ -DDM et 0,04% sodium cholate. His<sub>6</sub>BmrA E504A est ensuite décroché avec 200 mM d'imidazole. Le profil d'élution et le gel SDS-PAGE correspondant sont présentés dans la figure 76a. La protéine est éluée en un pic homogène mais contient plusieurs contaminants comme le montre la présence de bandes aux alentours de 34 et 110 kDa sur gel SDS-PAGE. Les fractions du pic sont rassemblées et la solution est diluée dix fois afin d'obtenir une concentration en imidazole de 20 mM et purifier BmrA par une deuxième étape de chromatographie d'affinité.

La résine, préalablement traitée avec de l'EDTA, est régénérée en utilisant une solution de sulfate de nickel. BmrA E504A est ensuite purifié en présence de 0,0675%  $\beta$ -DDM et 0,04% sodium cholate. Le profil d'élution de la protéine et le gel correspondant sont présentés sur la figure 76b. Grâce à cette seconde chromatographie, le degré de pureté de BmrA augmente significativement. Plus aucune protéine contaminante n'est observée au dessus de 55 kDa sur gel SDS-PAGE. Seules persistent quelques bandes contaminantes aux alentours de 50 et 34 kDa.

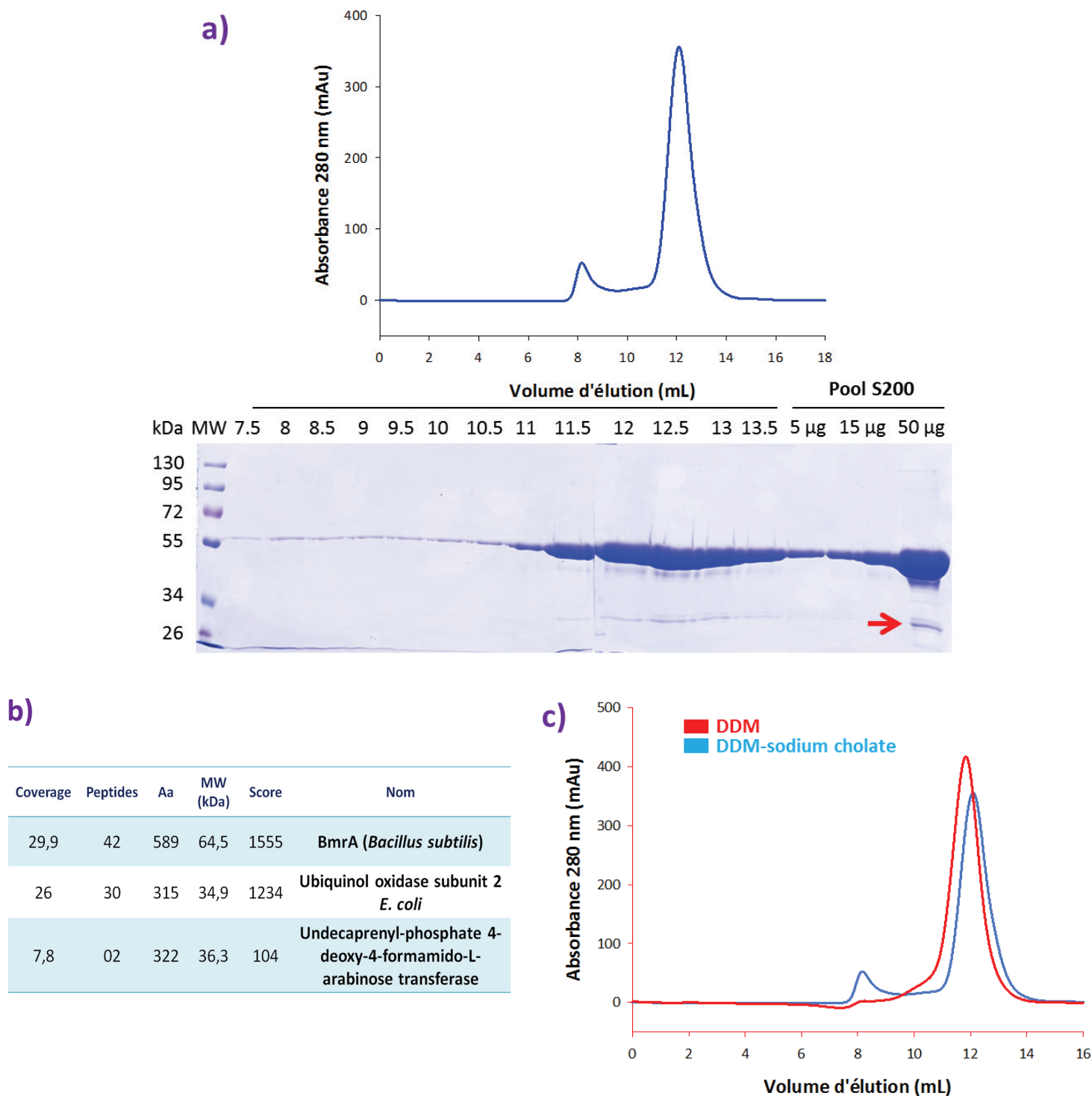
Les fractions correspondant au pic d'élution sont rassemblées et la solution est concentrée sur 50 kDa jusqu'à 500  $\mu$ l. Celle-ci est ensuite injectée sur colonne Superdex 200 d'exclusion diffusion, préalablement équilibrée avec 0,035%  $\beta$ -DDM et 0,01% sodium cholate.

a) 1<sup>ère</sup> chromatographie d'affinitéb) 2<sup>ème</sup> chromatographie d'affinité

**Figure 76 : BmrA E504A est purifié par deux chromatographies d'affinité sur nickel agarose successives.**

BmrA E504A est extrait des membranes avec 4,5% de triton. Le surnageant contenant les protéines solubilisées est chargé sur colonne d'affinité au nickel. Une fois les protéines fixées à la résine, le détergent est échangé contre 0,0675%  $\beta$ -DDM et 0,04% sodium cholate sur vingt volumes de colonne. Les protéines sont ensuite éluées avec 200 mM d'imidazole. a) Profil d'élution de la première chromatographie d'affinité et gel SDS-PAGE 10% correspondant aux fractions du pic d'élution. Les fractions correspondant au pic d'élution sont rassemblées et la solution est diluée dix fois pour obtenir une concentration en imidazole inférieure à 20mM. La résine de nickel est régénérée et BmrA est purifié en présence de 0,0675%  $\beta$ -DDM et 0,04% sodium cholate. B) Chromatogramme de la seconde chromatographie d'affinité et gel SDS-PAGE 10% correspondant aux fractions du pic d'élution.

Le profil d'élution de la protéine lors de la chromatographie d'exclusion ainsi que le gel correspondant sont présentés sur la figure 77a. Le pic d'agrégation à 8 ml est très minoritaire et le pic d'élution de BmrA à 12 ml est étroit et parfaitement symétrique. L'analyse par SDS-PAGE des fractions montre que la protéine est pure à 98%.



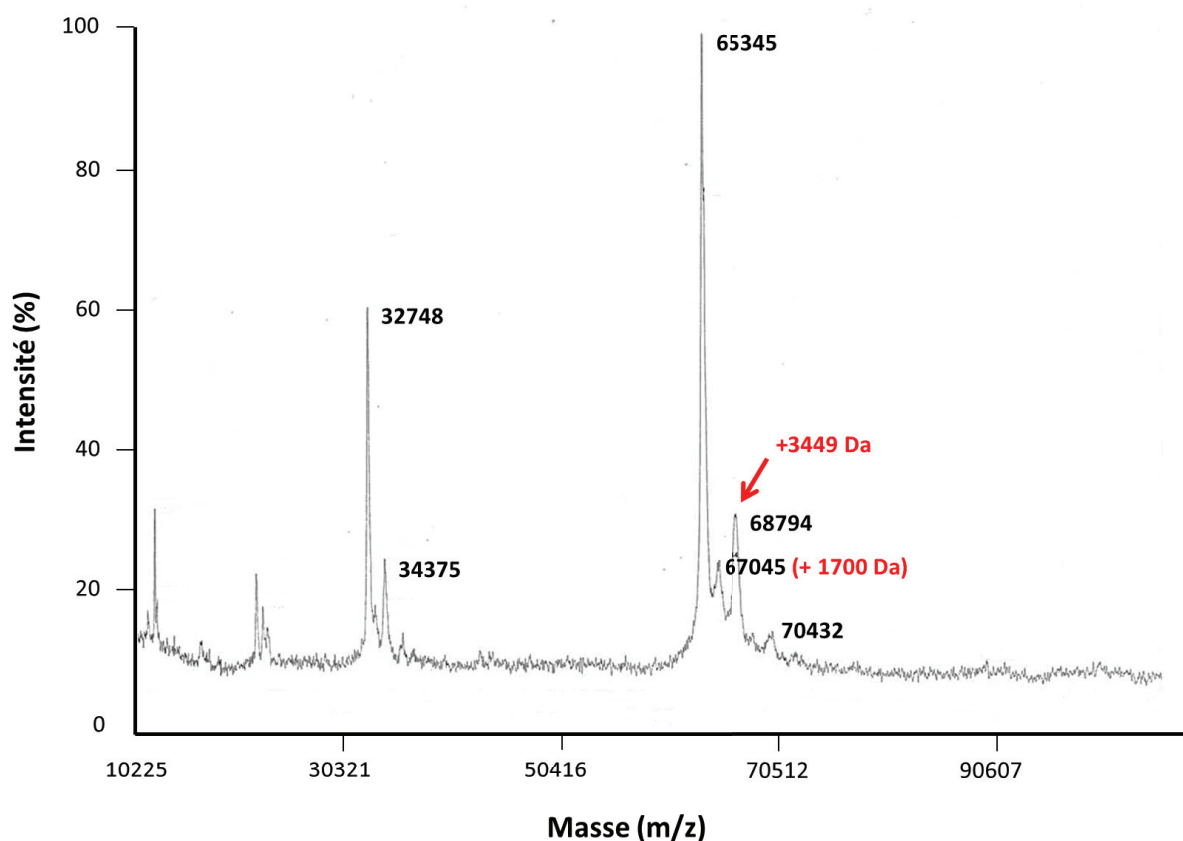
**Figure 77 : Analyse sur colonne d'exclusion de BmrA E504A purifié en  $\beta$ -DDM-sodium cholate.**

a) Profil d'élution de la protéine sur la colonne d'exclusion Superdex 200 et analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide 10% des différentes fractions du chromatogramme. La bande située à 34 kDa et indiquée par une flèche rouge a été découpée et analysée par LC-MS/MS. B) Identification des contaminants présents dans la purification de BmrA E504A en  $\beta$ -DDM-sodium-cholate. C) Superposition du profil d'élution obtenu (courbe bleue) avec celui de BmrA purifié en absence de sodium cholate (courbe rouge).

Une seule bande contaminante est présente aux alentours de 34 kDa. Son analyse par LC-MS/MS (figure 77b) révèle qu'il s'agit de produits de dégradation de BmrA et de l'ubiquinol oxydase d'*E. coli*, une enzyme qui intervient dans la chaîne de transport des électrons. Les échantillons ont ensuite été concentrés sur 50 kDa jusqu'à 15 mg/ml. Au final, ce protocole nous a permis d'obtenir 8 mg de BmrA pour environ 380 mg de protéines totales.

Afin d'évaluer l'influence ou non du cholate sur la taille du complexe protéine-détergent, nous avons comparé le profil d'élution de BmrA purifié en  $\beta$ -DDM-sodium cholate sur colonne d'exclusion Superdex 200 à celui obtenu précédemment avec BmrA purifié en présence de DDM seul (figure 77c). On remarque qu'en présence de cholate, le pic d'élution, centré aux alentours de 12 ml, sort légèrement plus tard que celui obtenu avec BmrA purifié en présence de DDM seul. Ceci permet de montrer que BmrA purifié en DDM-sodium cholate forme des complexes protéine-détergent de plus petite taille, ce qui pourrait ainsi favoriser les contacts protéine-protéine et l'empilement cristallin.

L'échantillon purifié en  $\beta$ -DDM-sodium cholate a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-Tof dans le but de vérifier la présence ou non d'adduits associés à BmrA, comme nous avons pu le constater précédemment avec BmrA E504A purifié en DDM ou LMNG seul. Le spectre, présenté dans la figure 78, indique la présence de deux pics aux alentours de 65 kDa. Le premier à 65345 Da correspond bien à la masse attendue pour le monomère de BmrA et le second à 68794 Da suggère qu'un adduit de 3449 Da est associé au monomère de BmrA. On remarque cette fois-ci l'absence d'adduit de 7 kDa puisqu'aucun pic n'est détecté à 72000 Da.



### Figure 78 : Spectre MALDI-TOF de BmrA E504A purifié en $\beta$ -DDM-sodium cholate.

Considérant l'ensemble de ces résultats encourageants, nous avons criblé à 4°C de nouvelles conditions de cristallisation en utilisant les kits commerciaux PEGs I et II. Etant donné le nombre important de précipités obtenus lors des essais de cristallisation réalisés avec BmrA E504A purifié en  $\beta$ -DDM ou LMNG seul, nous avons testé plusieurs concentrations de protéine en jouant sur les ratios protéine/précipitant avec par exemple deux volumes de protéine pour un volume de réservoir.

L'aspect des gouttes de cristallisation réalisées avec BmrA à 10 mg/ml et des ratios protéine/précipitant de 1:1 et 2:1 en fonction des différents agents précipitants testés sont illustrés sur la figure 79. Dans les essais réalisés avec un ratio 1:1, les PEGs de poids moléculaire supérieurs à 2000 Da conduisent à la formation d'un précipité amorphe. Tandis que les PEGs de poids moléculaire inférieurs à 1000 Da mènent à des précipités plus légers, ce qui confirme les résultats de cristallisation obtenus précédemment avec BmrA purifié en DDM et LMNG. En utilisant un ratio 2:1, l'augmentation de la concentration de protéine permet de sortir de la zone de précipitation du diagramme de phase. Ainsi, les PEGs compris entre 300 et 20000 Da conduisent à des gouttes limpides.

Il est très encourageant de constater que nous avons pu obtenir, au bout de sept jours, des micro-cristaux en présence de PEG 200. Ces cristaux, obtenus dans les conditions B1 (40% PEG 200, 0,1M Hepes NaOH pH 7,5) et B7 (40% PEG 200, 0,1M Tris-HCl pH 8,5) du kit PEG I, sont illustrés dans les figures 79 et 80. Ils sont nombreux, en forme de bâtonnets et de petite taille (environ 10 x 30  $\mu$ m). Nous avons donc tout d'abord essayé de reproduire ces cristaux en boîtes 96 puits. Nous avons fait varier la concentration en PEG 200 de 32 à 54% et le pH de la solution de cristallisation de 6,5 à 8,5 (figure 81). Des gouttes de 500  $\mu$ l ont été réalisées avec BmrA à 7 mg/ml et un ratio protéine/précipitant de 2:1. Les boîtes ont ensuite été incubées à 4°C et 19°C.

Les essais réalisés à 4°C ont permis d'obtenir des cristaux en forme d'« oursin » de 50 x 10  $\mu$ m qui apparaissent à la périphérie de la goutte dans la condition : 38% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0. En dessous de cette concentration, les gouttes restent limpides. A 41% de PEG200, les cristaux sont nombreux et de très petite taille (10 x 10  $\mu$ m). A partir de 44%, la protéine commence à précipiter. A pH 6,5, des micro-cristaux apparaissent à 38 et 41% de PEG 200. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à reproduire ces cristaux à pH supérieur à 7. Concernant les essais réalisés à 19°C, nous avons constaté que la protéine cristallise à des concentrations plus élevées en PEG 200, entre 44 et 47% à pH 6,5 et 7,0. En dessous de 41%, les gouttes sont limpides et la protéine précipite à partir de 54%. La morphologie de ces cristaux (70 x 10  $\mu$ m), formés d'un empilement de plaquettes, est différente de celle obtenue précédemment à 4°C.



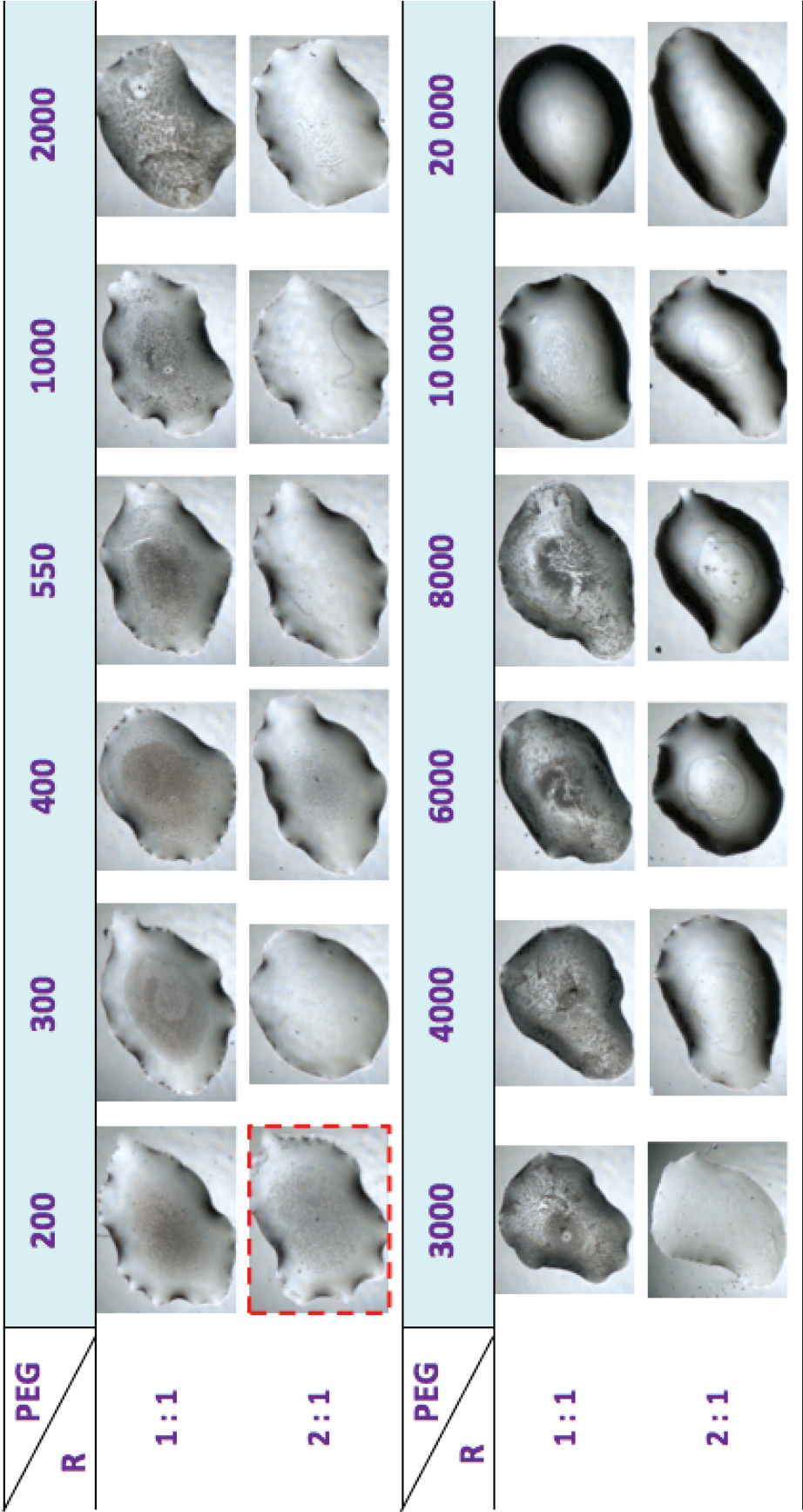


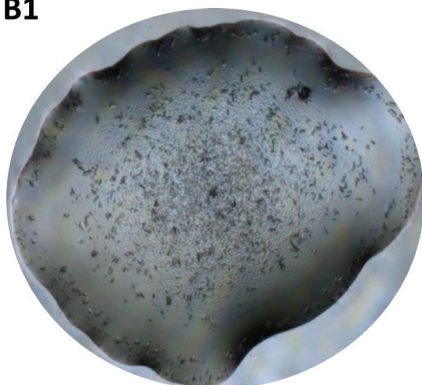
Figure 79 : Aspect des gouttes de cristallisation de BmrA E504A en DDM-sodium cholate en fonction des différents agents précipitants et ratios protéine-précipitant testés.

Technique de la goutte suspendue. [BmrA] = 10 mg/ml. Kit PEG I. Gouttes de 0,5 µl avec un ratio protéine/précipitant de 1:1 ou 2:1. Les micro-cristaux obtenus en présence de PEG 200 et un ratio 2:1 sont indiqués par un rectangle hachuré en rouge.



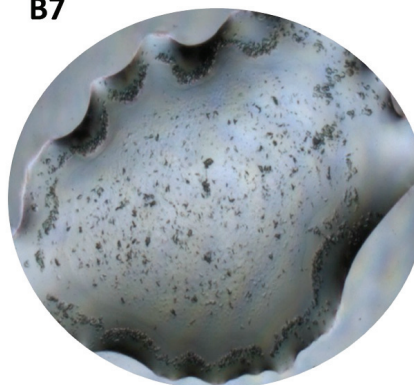
**PEG I, [BmrA] : 10 mg/ml, R 2: 1, 4°C :**

**B1**



**40% PEG 200, 0.1M Hepes  
NaOH pH 7.5**

**B7**



**40% PEG 200, 0.1M Tris-HCl  
pH 8.5**

**Figure 80 : Conditions de cristallisation les plus prometteuses obtenues dans le kit PEG I pour la protéine BmrA E504A en  $\beta$ -DDM-sodium cholate.**

Nous avons ensuite testé la diffraction des cristaux dont la taille dépassait 50  $\mu\text{m}$  de longueur à l'ESRF sur la ligne de lumière BM30A. Nous n'avons pas eu besoin d'optimiser les conditions cryogéniques étant donné que le PEG 200 utilisé à forte concentration constitue un bon cryo-protecteur. Aucun des cristaux obtenus à 4°C n'a diffracté les rayons X. En revanche, plusieurs cristaux apparus dans la condition : 44% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0 à 19°C ont diffracté jusqu'à 20 Å de résolution. Les clichés de diffractions enregistrés pour l'un d'eux à 0 et 90° sont présentés sur la figure 82. Les taches de diffractions observées à basse résolution confirment que cette fois-ci il s'agit bien de cristaux de protéine.

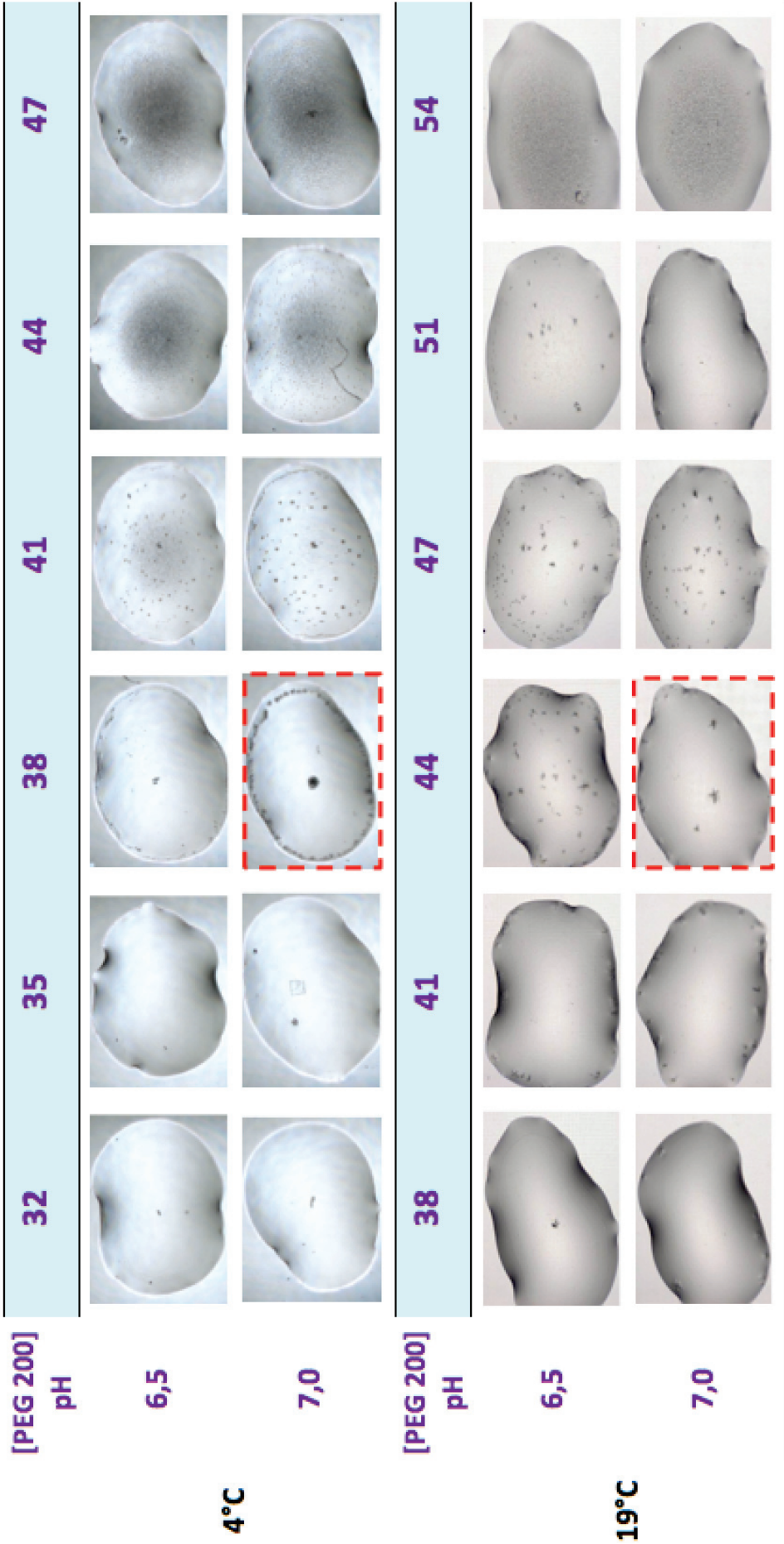
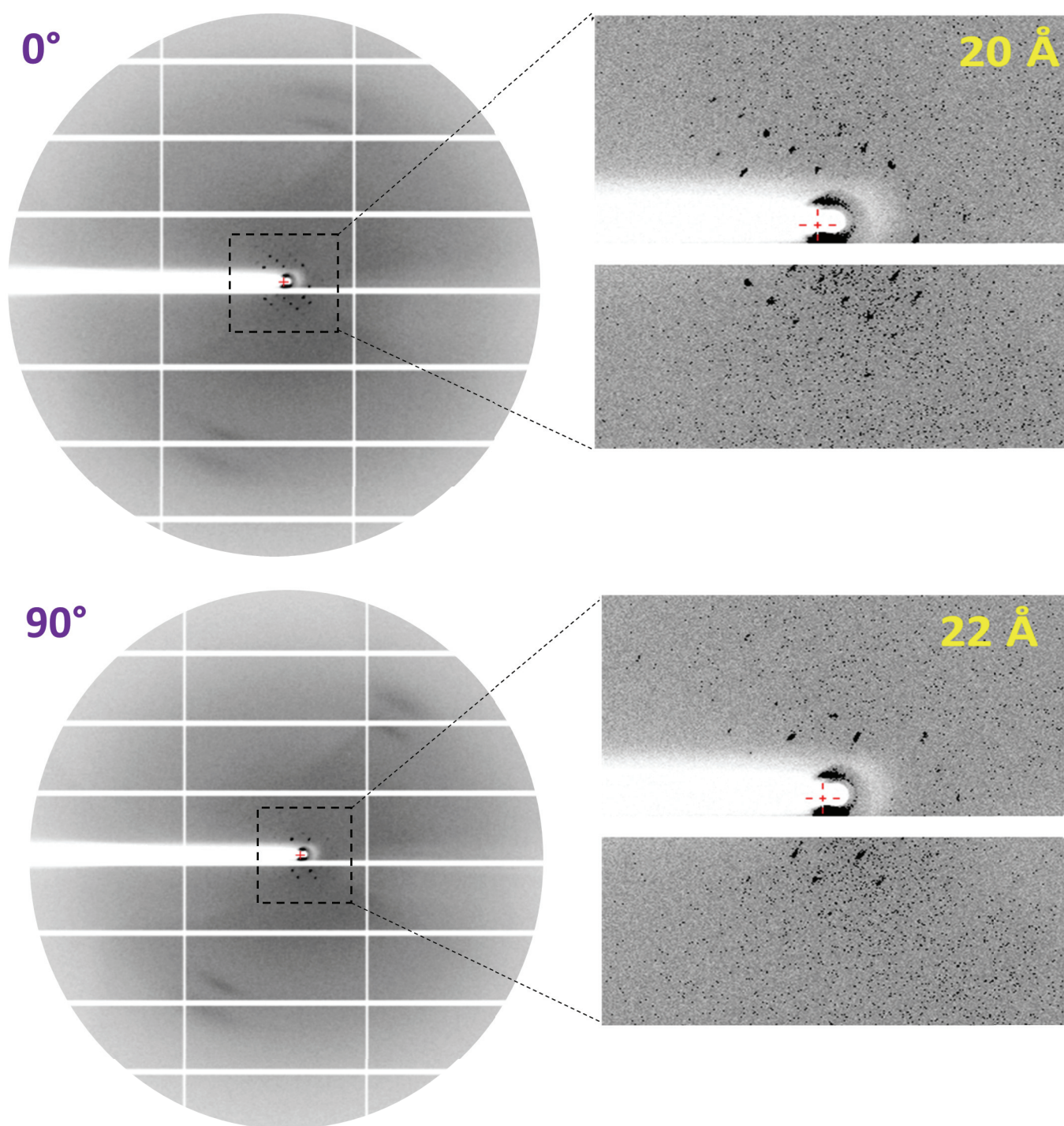


Figure 81 : Aspect des gouttes de cristallisation de BmrA E504A en DDM-sodium cholate en fonction de différentes concentrations de PEG 200 à pH 6,5 et 7,0.

Technique de la goutte suspendue. [BmrA] = 7 mg/ml. Gouttes 0,5 µl. Ratio protéine/précipitant 2:1.



**Figure 82 : Clichés de diffraction enregistrés à 0 et 90°.**

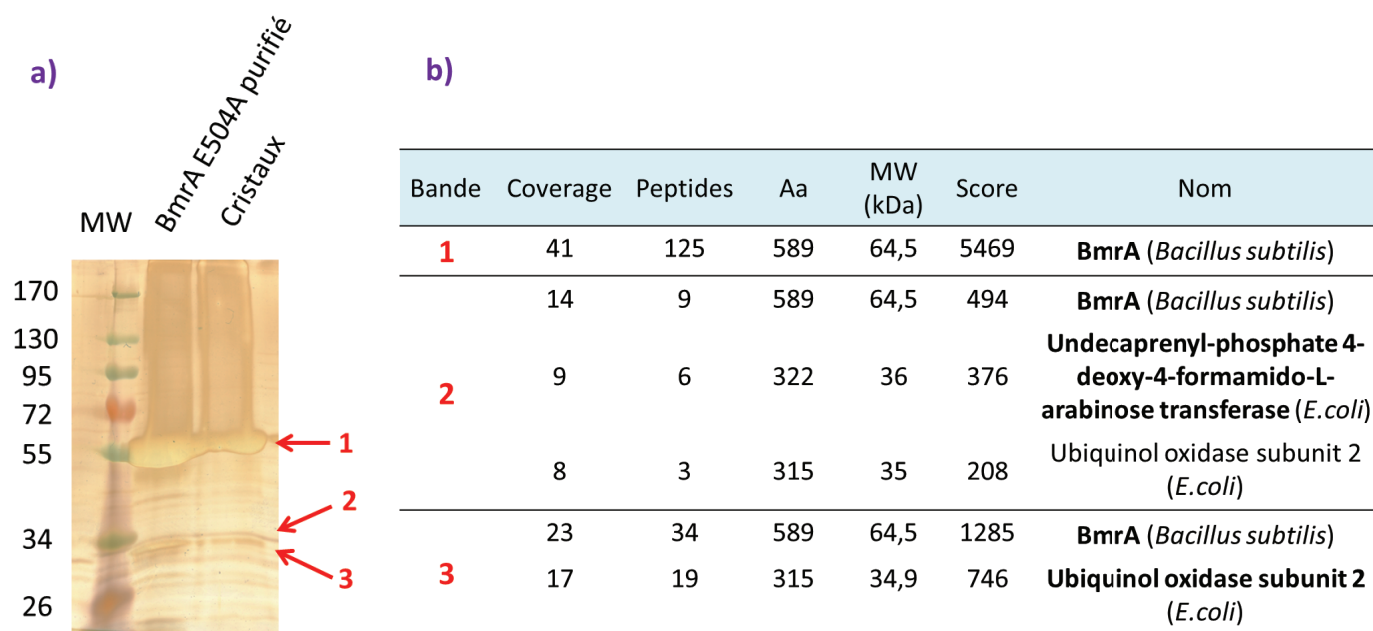
Clichés de diffraction du cristal obtenu à partir de la condition : 44% PEG 200, pH 7,0 à 19°C avec BmrA à 7 mg/ml et un ratio protéine/précipitant 2:1. Les données de diffraction ont été collectées sur la ligne de lumière BM30A. Les clichés enregistrés à 0 et 90° présentent respectivement une limite de résolution de 20 et 22 Å.

**S'agit-il de cristaux correspondant à BmrA ?**



Avant d'essayer d'améliorer la qualité de diffraction de ces cristaux, nous avons souhaité nous assurer qu'il s'agissait bien de cristaux de BmrA.

Ainsi, nous avons reproduit 96 fois la condition : 44% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0, BmrA à 7 mg/ml avec un ratio protéine/précipitant 2:1 à 19°C, pour déposer les cristaux obtenus sur gel SDS-PAGE. Au préalable, une cinquantaine de cristaux supérieurs à 70 µm de longueur ont été prélevés avec une boucle de taille adaptée puis lavés trois fois dans des gouttes de 2 µl contenant la solution du réservoir afin d'éliminer les protéines contaminantes non précipitées. Ces cristaux, dissous dans la solution de cristallisation, ont été caractérisés sur un gel SDS-PAGE 10% coloré au nitrate d'argent (figure 83).



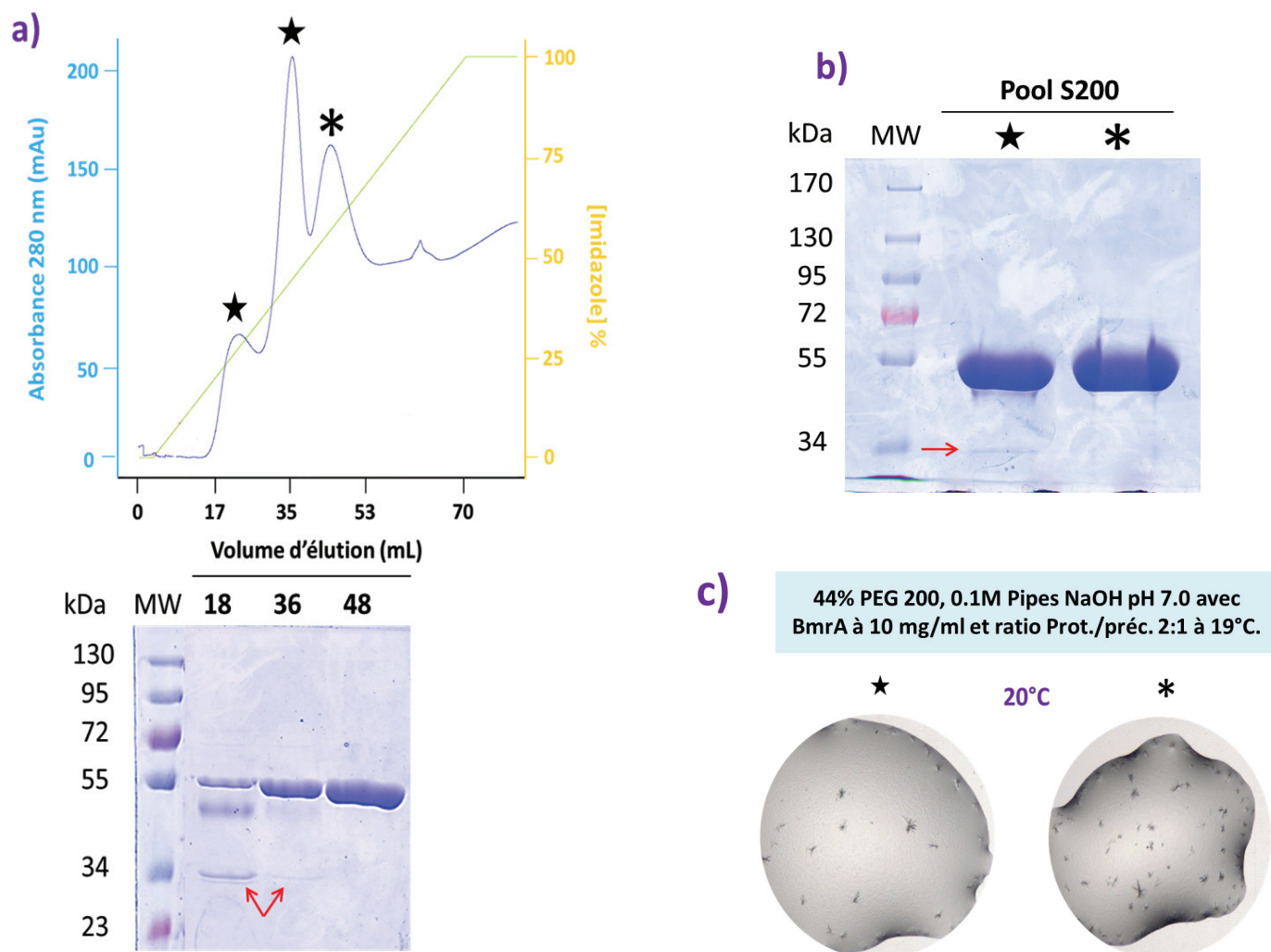
**Figure 83 : Analyse et identification des cristaux.**

A) Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide 10% d'une cinquantaine de cristaux dissous dans la solution de cristallisation (44% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0). Piste 2 : protéine BmrA témoin, piste 3 : cristaux dissous. B) Analyse par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) des bandes du gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent.

Dans la piste 3, l'observation d'une bande à 55 kDa au même niveau que le dépôt de BmrA témoin (piste 2) ainsi que l'analyse de cette bande par LC-MS/MS confirment la présence de BmrA dans la solution de cristaux dissous. Deux autres bandes, beaucoup plus fines, sont visibles aux alentours de 34 kDa. Leur analyse par spectrométrie de masse révèle la présence de produits de dégradation de BmrA et de deux contaminants d'*E. coli* : l'ubiquinol oxydase et l'arabinose transférase. Une seule structure de l'ubiquinol oxydase d'*E. coli* a jusqu'à maintenant été résolue (Abramson et al., 2000). Cette protéine a été purifiée et cristallisée avec 1% d'octyl β-D glucopyranoside dans la condition : 10% PEG 1500, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub> et 5% éthanol à une concentration de 10 mg/ml et un ratio

protéine/précipitant 1:1. Quant à l'arabinose transférase, aucune structure n'a été déterminée. Il est donc très probable que les cristaux obtenus correspondent à la protéine BmrA.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons essayé d'éliminer ces deux contaminants et de relancer des essais de cristallisation dans la condition initiale. Nous avons ainsi procédé à un changement par rapport au protocole de purification utilisé précédemment. L'élution de la seconde chromatographie d'affinité a été réalisée par un gradient linéaire de 20 à 250 mM d'imidazole sur douze volumes de colonne. Le profil d'élution ainsi que le gel correspondant sont présentés dans la figure 84a. BmrA est élué majoritairement dans le deuxième et le troisième pic. On observe des bandes peu intenses d'environ 34 kDa dans les fractions correspondant au premier et au second pic d'élution. Leur analyse par LC-MS/MS confirme qu'il s'agit bien de l'ubiquinol oxydase, de l'arabinose transférase et de produits de dégradation de BmrA.



un astérisque ont été regroupées en deux échantillons. Ils ont ensuite été injectés sur colonne de gel filtration puis concentrés jusqu'à 15 mg/ml. B) 50 µg de chaque échantillon concentré a été déposé sur gel SDS-PAGE 10%. Les bandes correspondant à l'ubiquinol oxydase et à l'arabinose transférase sont indiquées par une flèche rouge. C) Cristallisation de chaque échantillon de BmrA à 19°C dans la condition : 44% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0 avec BmrA 10 mg/ml et un ratio protéine/précipitant 2:1.

Nous avons regroupé les fractions correspondant aux deux premiers pics d'élution ensemble puis celles correspondant au troisième pic séparément. Ces deux échantillons ont été injectés sur une colonne de gel filtration puis concentrés jusqu'à 15 mg/ml. Le gel SDS-PAGE correspondant aux fractions concentrées est présenté dans la figure 84b et confirme l'absence de contaminants dans l'échantillon de BmrA issu du troisième pic d'élution de la chromatographie d'affinité. Nous avons réalisé à 19°C des essais de cristallisation dans la condition : 44% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0 avec BmrA à 7 mg/ml et un ratio protéine/précipitant 2:1 (figure 84c). Dans les deux cas, nous sommes parvenus à obtenir des cristaux d'environ 80 x 10 µm. Nous pouvons donc en conclure que les cristaux obtenus sont bien ceux de BmrA.

### Optimisation des cristaux de BmrA

Nous avons ainsi retenu les deux conditions de cristallisation précédentes comme point de départ pour des essais d'optimisation :

(I) 44-47% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0, [BmrA] = 7 mg/ml, ratio 2:1 à 19°C.

(II) 38-40% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0, [BmrA] = 7 mg/ml, ratio 2:1 à 4°C.

Dans ces conditions, les cristaux sont nombreux, petits et diffractent à basse résolution. Nous avons ajusté finement plusieurs paramètres afin d'obtenir des cristaux de taille et qualité de diffraction satisfaisantes pour permettre la résolution de la structure de BmrA.

#### a) Influence du sel

Les cristaux obtenus jusqu'à maintenant à 19°C sont formés par l'empilement de plusieurs plaquettes et ceux à 4°C sont formés de petites aiguilles qui poussent dans toutes les directions de l'espace. Nous avons donc tout d'abord cherché à obtenir des monocristaux c'est-à-dire un seul et unique cristal de taille et épaisseur importantes.

Nous avons testé l'addition de différents sels de manière à augmenter les interactions entre protéine et ainsi favoriser l'empilement cristallin dans une seule direction de l'espace. En effet, les sels ont la capacité d'influencer les interactions en modifiant les charges et l'hydratation de la protéine. Pour cela, nous avons réalisé à 4°C et 19°C, une gamme de 32 à 52% de PEG 200 dans des boîtes 96 puits en ajoutant 0,2M de chlorure de sodium (NaCl), chlorure de potassium (KCl), chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>), sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), iodure de sodium (NaI), acétate de sodium (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na), fluorure de sodium (NaF) et sulfate de sodium(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).



BmrA cristallise uniquement en présence de NaCl et KCl. Comme illustré dans la figure 85, le chlorure de sodium et le chlorure de potassium augmentent la taille des cristaux et favorisent leur croissance d'environ 100  $\mu\text{m}$  dans le sens de la longueur. A 19°C, les cristaux restent formés par l'empilement d'une dizaine de plaquettes (figure 85b). En revanche, à 4°C, leur morphologie est modifiée (figure 85a); ils forment soit des plaquettes qui se superposent en présence de NaCl, soit des cristaux de 150 x 40 x 50  $\mu\text{m}$ , irréguliers et non homogènes sur chacune de leurs faces, en présence de KCl. Ces cristaux sont qualifiés de multiples car ils correspondent à l'association de plusieurs cristaux identiques dans des orientations différentes.

Leur capacité à diffracter les rayons X a été testée à l'ESRF. Les clichés présentés dans la figure 85 montrent que l'ajout de KCl améliore la limite de diffraction des cristaux jusqu'à 8 Å à 4°C et 13 Å à 19°C. Ces données sont prometteuses mais restent malgré tout inexploitable car que ce soit à 4°C ou à 19°C, plusieurs réseaux cristallins (position des taches de diffraction sur le détecteur) se superposent et s'entrecroisent sur les clichés de diffraction. Il n'est donc pour l'instant pas possible de déterminer dans quel groupe d'espace cristallise BmrA. Après cette étape, nous avons donc abouti aux conditions :

(III) BmrA 7 mg/ml, ratio 2:1, 38-40% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0, 0,2M KCl à 4°C.

(IV) BmrA 7 mg/ml, ratio 2:1, 44-47% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0, 0,2M KCl à 19°C.

## **b) La technique d'ensemencement**

Comme nous venons de le voir, l'ajout de KCl à 4°C améliore significativement le pouvoir diffractant des cristaux. L'inconvénient en revanche est que ces derniers mettent environ trois semaines à apparaître, contre seulement une nuit à 19°C. Afin de gagner du temps dans le résultat de nos essais, nous avons utilisé la technique d'ensemencement pour essayer d'améliorer la morphologie des cristaux à 19°C. L'ajout de germes cristallins devrait permettre aux protéines de s'organiser autour d'eux et ainsi favoriser la croissance de monocristaux.

Une trentaine de cristaux, reproduits de façon intensive dans la condition I, ont été prélevés puis broyés au vortex dans la solution réservoir. Cette solution stock a été diluée par deux et par cinq pour obtenir des solutions d'ensemencement à 50% et 20%. Les microcristaux ont ensuite été ajoutés à 10% final autour des conditions III et IV en faisant varier de 32 à 52% la concentration de PEG 200.

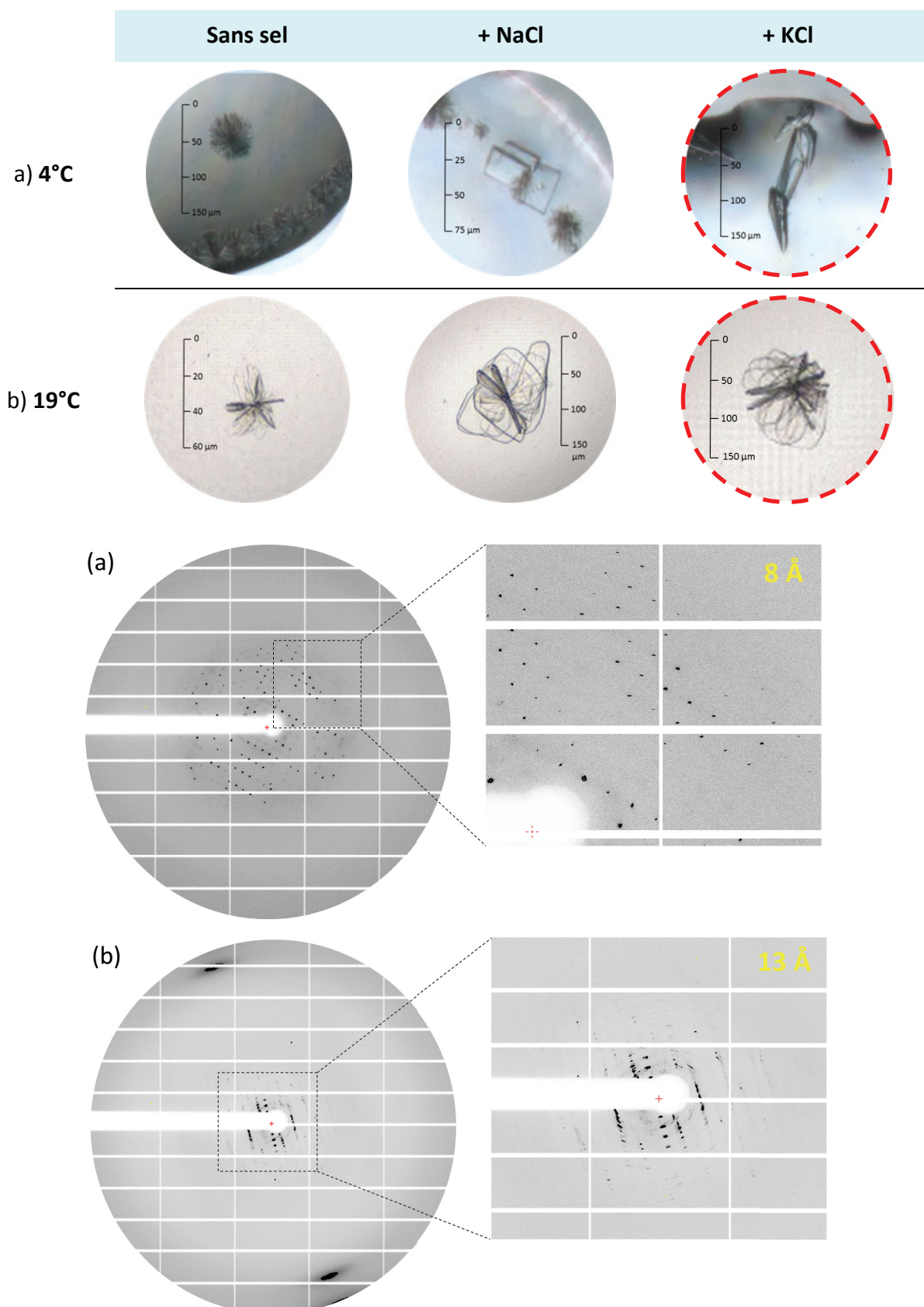
Les conditions testées nous ont permis de reproduire à 4°C en absence d'ensemencement des cristaux multiples et irréguliers de 200 x 50 x 30  $\mu\text{m}$  puis à 19°C des plaques de 30 x 30 x 2  $\mu\text{m}$  qui se superposent. Lorsque nous ajoutons à ces mêmes conditions des broyats de cristaux, nous observons, après un mois à 4°C, la formation de petits cristaux en forme d'oursin (figure 86a). En revanche, après cinq jours à 19°C, on constate la formation d'imposantes plaques de 200 x 100 x 2  $\mu\text{m}$  qui se superposent de façon désordonnée (figure 86b). Les clichés de diffraction présentés dans la figure 86 indiquent une limite de diffraction de 7 Å à 4°C et de 17 Å à 19°C. Une nouvelle fois, plusieurs réseaux se chevauchent, rendant ces données inexploitable.

La technique d'ensemencement ne nous a pas permis d'améliorer la morphologie et la diffraction des cristaux de BmrA. Nous avons donc abandonné la cristallisation à 19°C et poursuivi nos essais à 4°C.

### **c) Influence du précipitant**

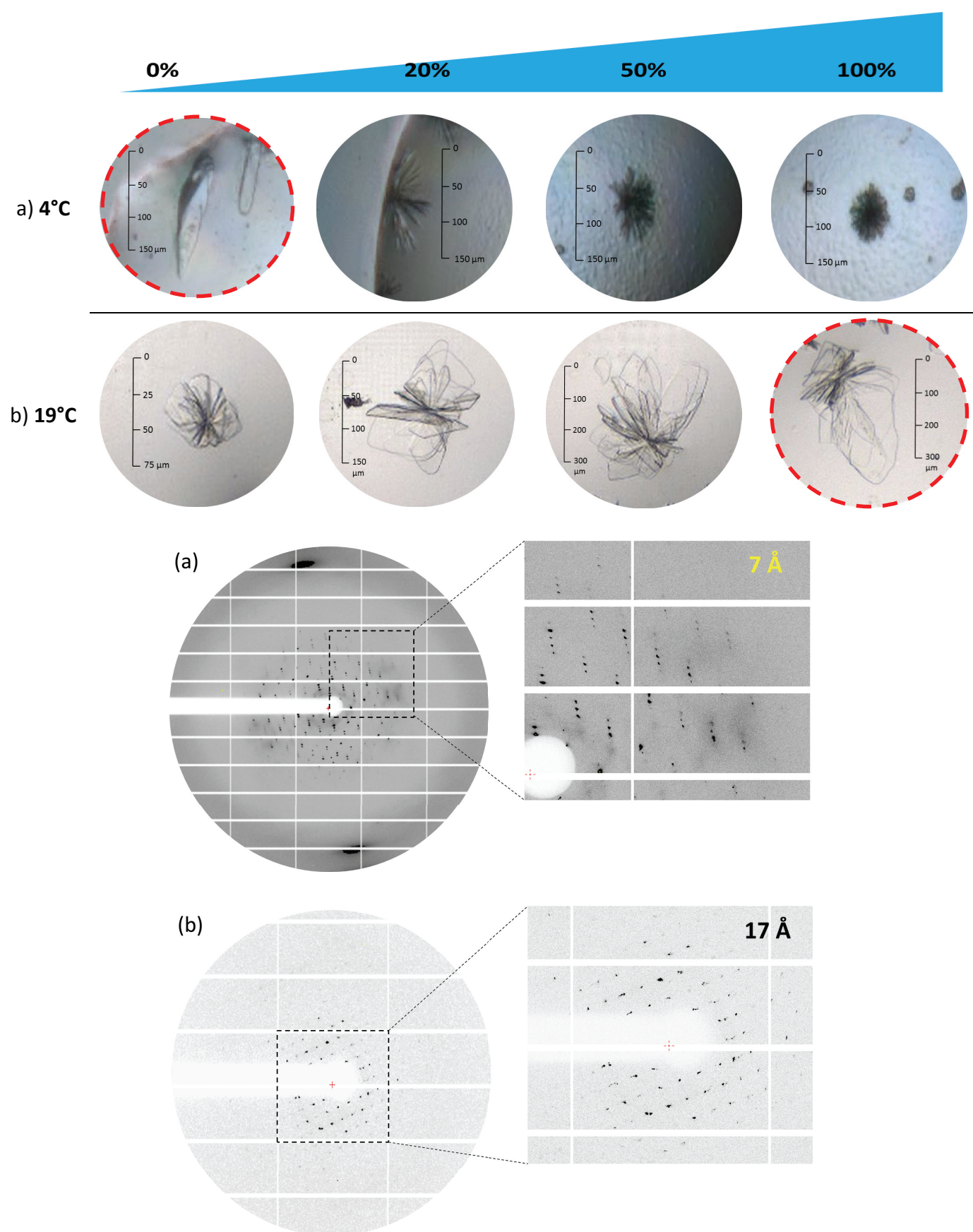
Si la condition III a amélioré la taille et le pouvoir diffractant des cristaux, elle n'a en revanche pas permis d'obtenir de monocristaux. Nous avons donc réalisé une nouvelle série d'essais en jouant cette fois-ci sur la nature du PEG. Nous avons supposé qu'en utilisant des PEGs de plus haut poids moléculaire, nous pourrions limiter les interactions entre la protéine et l'eau au profit des interactions protéine-protéine et ainsi favoriser l'apparition de cristaux uniques.

Pour tester cette hypothèse, nous avons employé les PEGs 300, 400, 550 MME, 600 et 1000. Mais la figure 87 montre qu'il n'en n'est rien et que seul le PEG 200 permet de cristalliser BmrA. Avec les autres PEGs, les gouttes restent limpides à basse concentration et précipitent à partir de 35%, ce qui signifie que la protéine parvient bien dans les zones de nucléation et de précipitation du diagramme de phase. Mais que l'énergie d'activation fournie aux protéines n'est pas suffisante pour favoriser leur association et initier la nucléation.



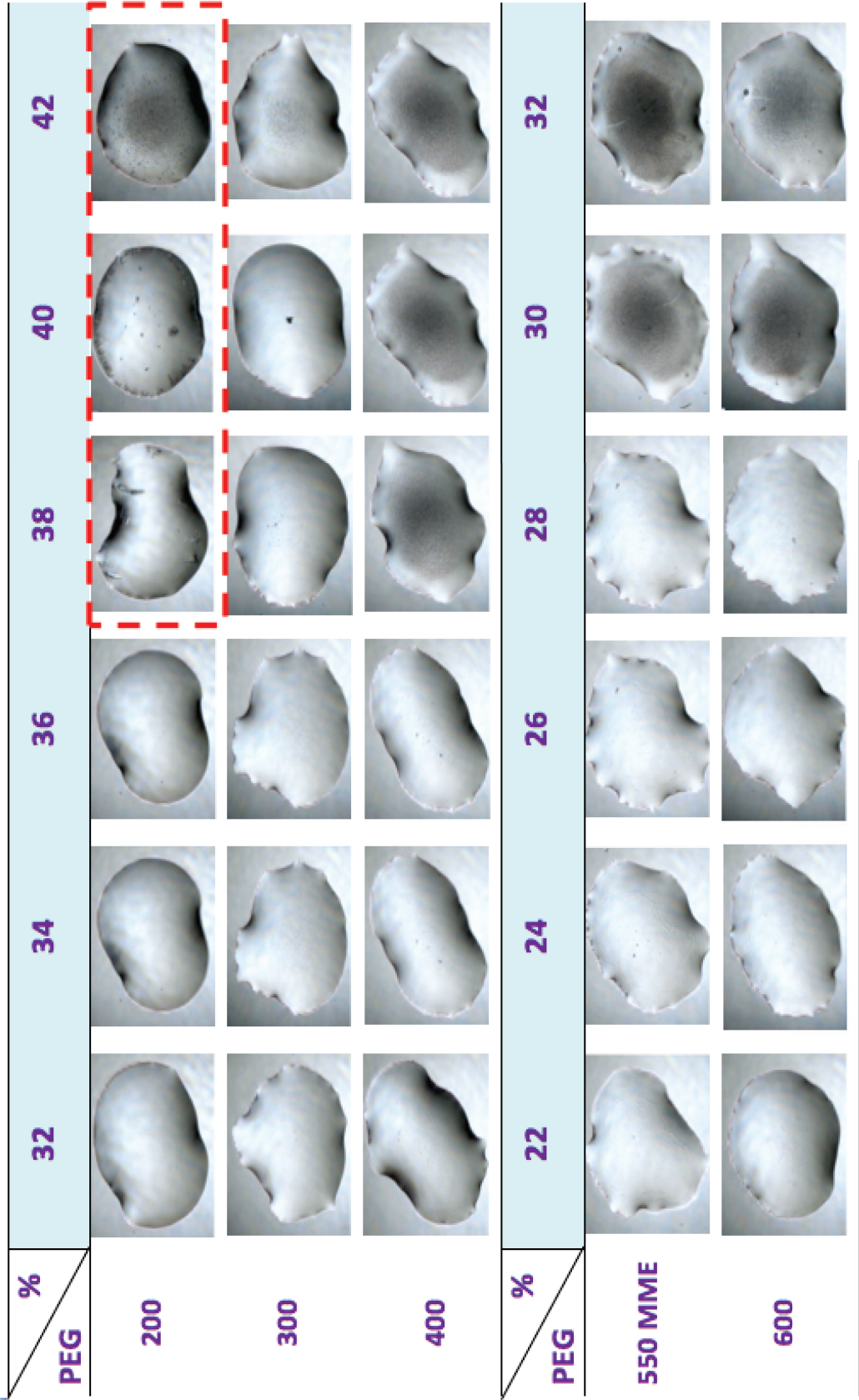
**Figure 85 : Influence du sel sur la cristallisation de BmrA E504A.**

Les cristaux entourés par un cercle rouge hachuré ont été testés à l'ESRF. Leur cliché de diffraction respectif est présenté dans la partie inférieure de la figure.



**Figure 86 : Influence de la technique d'ensemencement sur la cristallisation de BmrA E504A.**





**Figure 87 : Aspect des gouttes de cristallisation de BmrA E504A en fonction de la nature et la concentration du PEG testé.**  
Gouttes obtenues à partir de la condition III dans laquelle le PEG 200 est remplacé par le PEG 300, 400, 550 MME et 600.

#### d) Influence de [KCl], de [BmrA], du pH et du ratio protéine/précipitant

Les essais suivants ont porté sur l'optimisation de la concentration de KCl. On s'attend à ce qu'une augmentation de la concentration en sel diminue la solubilité de la protéine et favorise les interactions protéine-protéine. Pour cela, nous avons reproduit la condition III en faisant varier la concentration en KCl de 0,1 à 0,4M.

Comme illustré dans la figure 88, une concentration plus faible génère de petits cristaux en forme d'oursin qui ne diffractent pas les rayons X. A 0,2M de KCl, la taille du cristal atteint 300 x 100 x 40  $\mu\text{m}$  mais reste encore très multiple. En revanche, à 0,3 et 0,4M, la qualité des cristaux s'améliore significativement. L'utilisation de 0,3M de KCl a permis d'obtenir des monocristaux de 350 x 100 x 50  $\mu\text{m}$  avec les faces (visibles) lisses et non multiples. Les cristaux ont été testés à l'ESRF et ont produit des clichés de diffractions, comme ceux de la figure 88. A 0,2M KCl, la résolution atteinte est de 8 Å avec plusieurs réseaux qui se juxtaposent. En revanche, l'utilisation de 0,3M KCl améliore sensiblement la qualité des clichés avec des spots uniques qui indiquent la présence d'un seul réseau cristallin. Cette condition optimale de cristallisation nous a permis de collecter un jeu de données de 3500 images à 8,0 x 7,5 Å de résolution. L'indexation des données avec le programme MOSFLM a permis de déterminer que BmrA cristallise dans le groupe d'espace orthorhombique  $P2_12_12_1$ . Les paramètres de maille sont  $a = 96 \text{ Å}$  ;  $b = 99 \text{ Å}$  ;  $c = 238 \text{ Å}$  ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ .

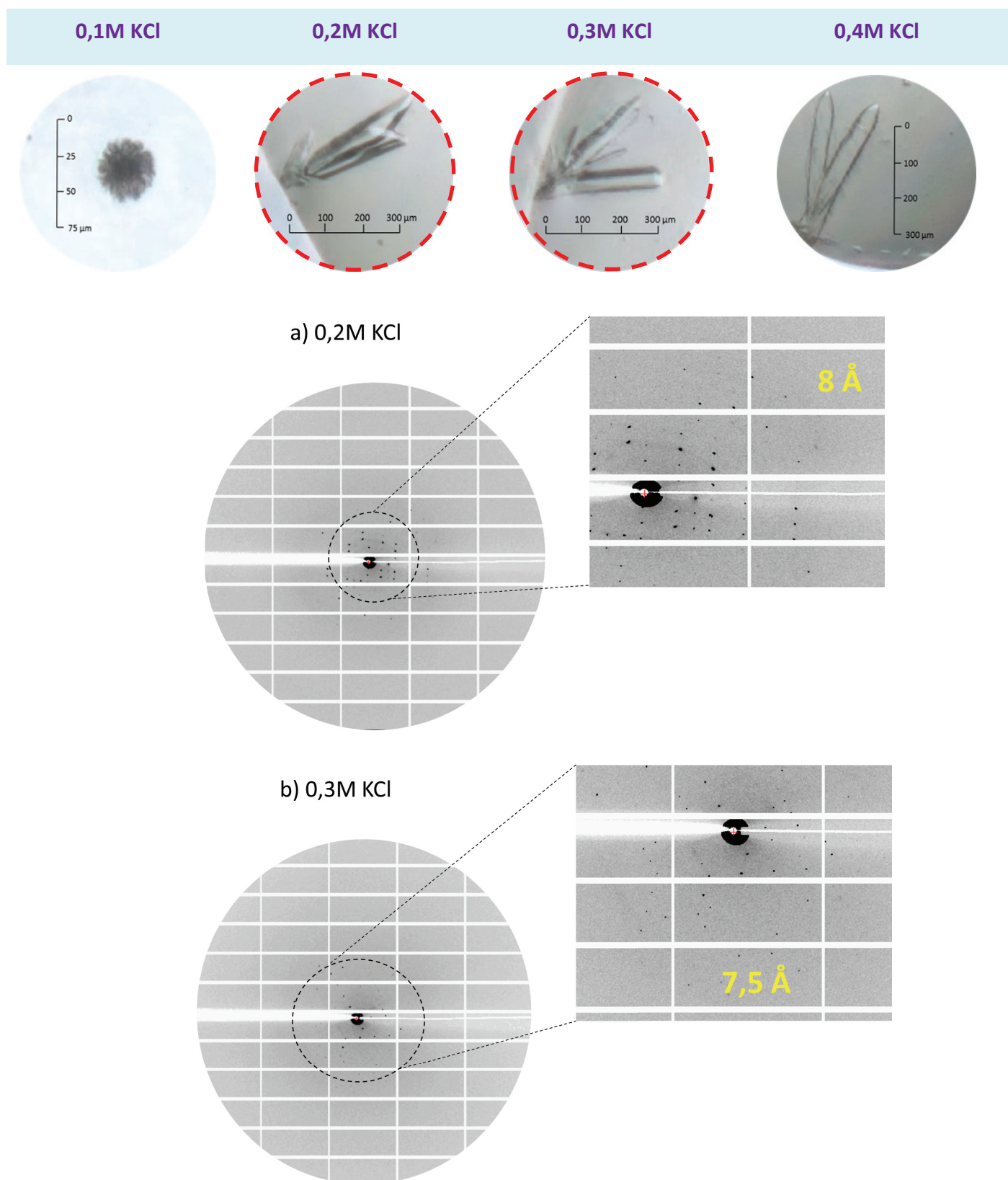
La meilleure condition obtenue à ce stade est donc :

(V) BmrA 7 mg/ml, ratio 2:1, 38-40% PEG 200, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0 et 0,3M KCl à 4°C.

Une résolution de 8 Å est très encourageante mais reste encore insuffisante pour déterminer la structure d'une protéine. Il est donc indispensable d'améliorer la qualité macroscopique et le pouvoir diffractant de ces cristaux. Pour y parvenir, nous avons tout d'abord optimisé la concentration de BmrA. Etant donné que la majorité des gouttes obtenues précédemment à 7 mg/ml étaient claires, nous avons reproduit la condition V en testant des concentrations de BmrA plus importantes (10 et 15 mg/ml). Nous avons supposé qu'un état de sursaturation plus élevé permettrait d'initier la nucléation de la protéine et d'atteindre ensuite plus lentement la zone métastable, ce qui aboutirait à des cristaux plus gros.

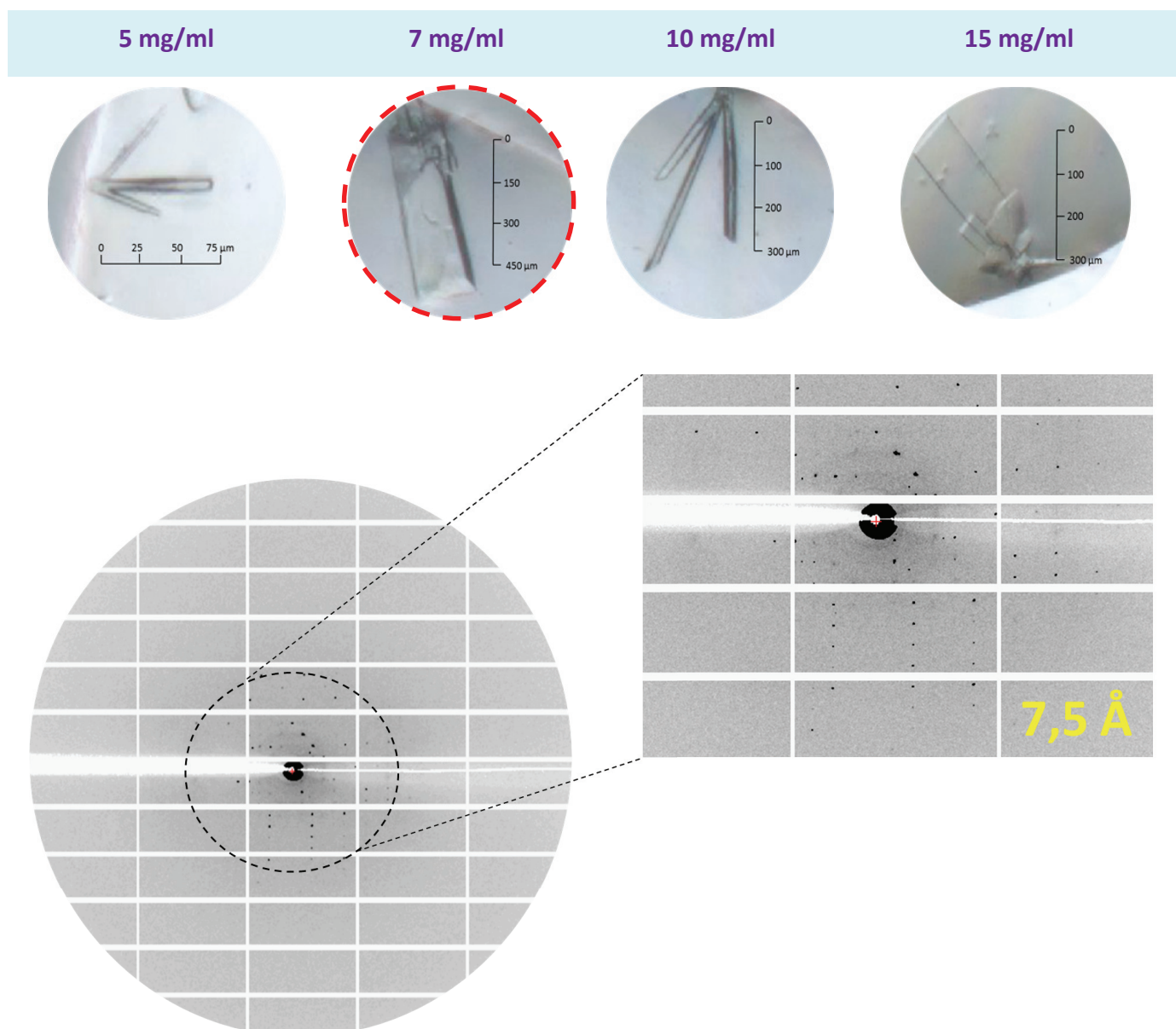
La figure 89 montre qu'il n'en n'est rien et que l'effet principal obtenu est une réduction de la taille et de la qualité des cristaux. On obtient à 10 mg/ml des baguettes de 300 x 50 x 10  $\mu\text{m}$  et à 15 mg/ml de fines plaques, qui diffractent les rayons X au mieux à 15 Å de résolution. Nous sommes parvenus à reproduire à 7 mg/ml des monocristaux de 500 x 150 x 100  $\mu\text{m}$  mais sans améliorer le niveau de diffraction qui a atteint 7,5 Å. L'indexation de ces données confirme malgré tout que BmrA cristallise dans le groupe d'espace  $P2_12_12_1$ .





**Figure 88 : Influence de [KCl] sur la cristallisation de BmrA E504A.**

Cristaux obtenus à partir de la condition III avec 0,1 à 0,4M KCl. Les cristaux entourés par un cercle haruché en rouge ont été testés à l'ESRF et le cliché de diffraction enregistré à 0° est présenté dans la partie inférieure de la figure.

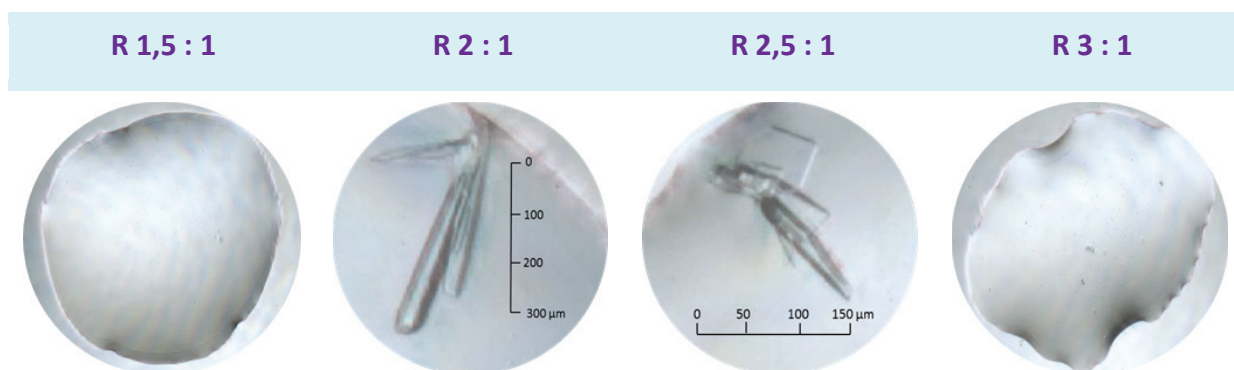


**Figure 89 : Influence de [BmrA] sur la cristallisation de BmrA.**

Cristaux obtenus à partir de la condition V avec [BmrA] à 5, 7, 10 et 15 mg/ml. Le cristal entouré par un cercle haruché en rouge a été testé à l'ESRF et le cliché de diffraction enregistré à  $0^\circ$  est présenté dans la partie inférieure de la figure.

Toujours dans l'idée de ralentir la croissance des cristaux et ainsi favoriser leur épaisseur, nous avons augmenté la concentration de BmrA en testant des ratios protéine/précipitant de 2,5:1 et 3:1 autour de la condition V.

Comme illustré dans la figure 90, BmrA cristallise uniquement dans des ratios 2:1 et 2,5:1. Dans ce dernier, la taille et la qualité des cristaux se dégradent. Un ratio protéine/précipitant de 2:1 semble donc préférable.

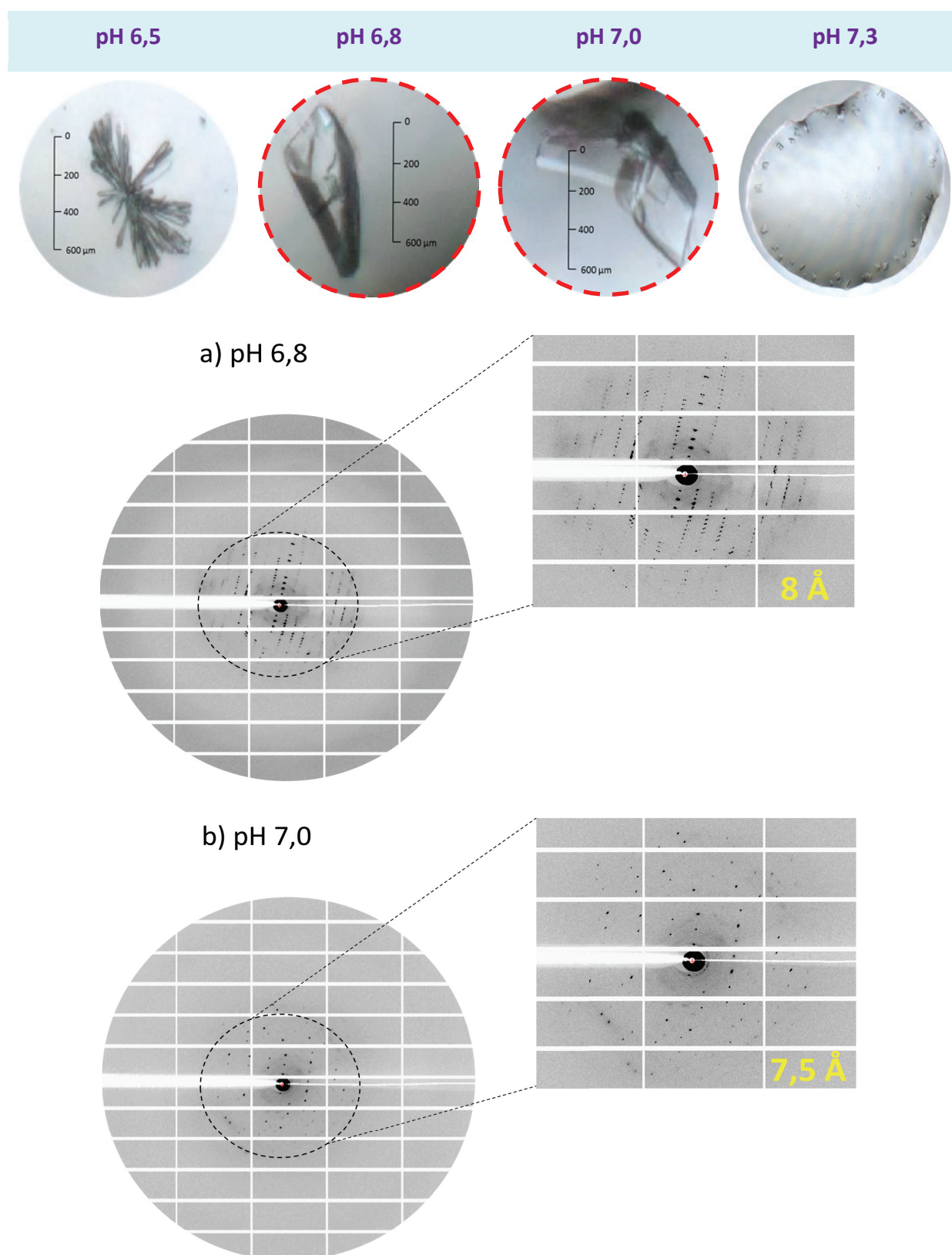


**Figure 90 : Influence du ratio protéine/précipitant sur la cristallisation de BmrA.**

Cristaux obtenus à partir de la condition V avec des ratios protéine/précipitant 1,5:1, 2:1, 2,5:1 et 3:1.

Le pH est un autre paramètre pouvant moduler les interactions entre protéines dans le cadre de la cristallisation. C'est pourquoi nous avons testé autour de la condition V une gamme de pH comprise entre 6,5 et 7,5 avec un pas de 0,2. Cette variation de pH provoque d'importants changements sur la cristallisation de BmrA, comme le montre la figure 91. A pH 6,5, la protéine cristallise sous la forme d'étoiles ou d'oursins qui ne diffractent pas les rayons X. A partir de 6,8, la taille des cristaux atteint 600 x 200 x 100 μm mais ils restent très multiples comme le montre le cliché de diffraction enregistré à 0° qui est présenté sur la figure 91. Lorsque le pH se rapproche du point isoélectrique de BmrA (6,9), on obtient des monocristaux de 600 x 300 x 200 μm. Un jeu de données parfaitement isotrope à 7,5 x 7,5 Å de résolution a pu être collecté à partir de ce cristal, le meilleur que nous ayons obtenu jusqu'ici. Le traitement des données avec MOSFLM confirme encore une fois que BmrA cristallisait dans le groupe d'espace orthorhombique  $P2_12_12_1$ . En revanche, à partir de pH 7,3, lorsque la charge nette de la protéine augmente, BmrA ne cristallise plus.





**Figure 91 : Influence du pH sur la cristallisation de BmrA.**

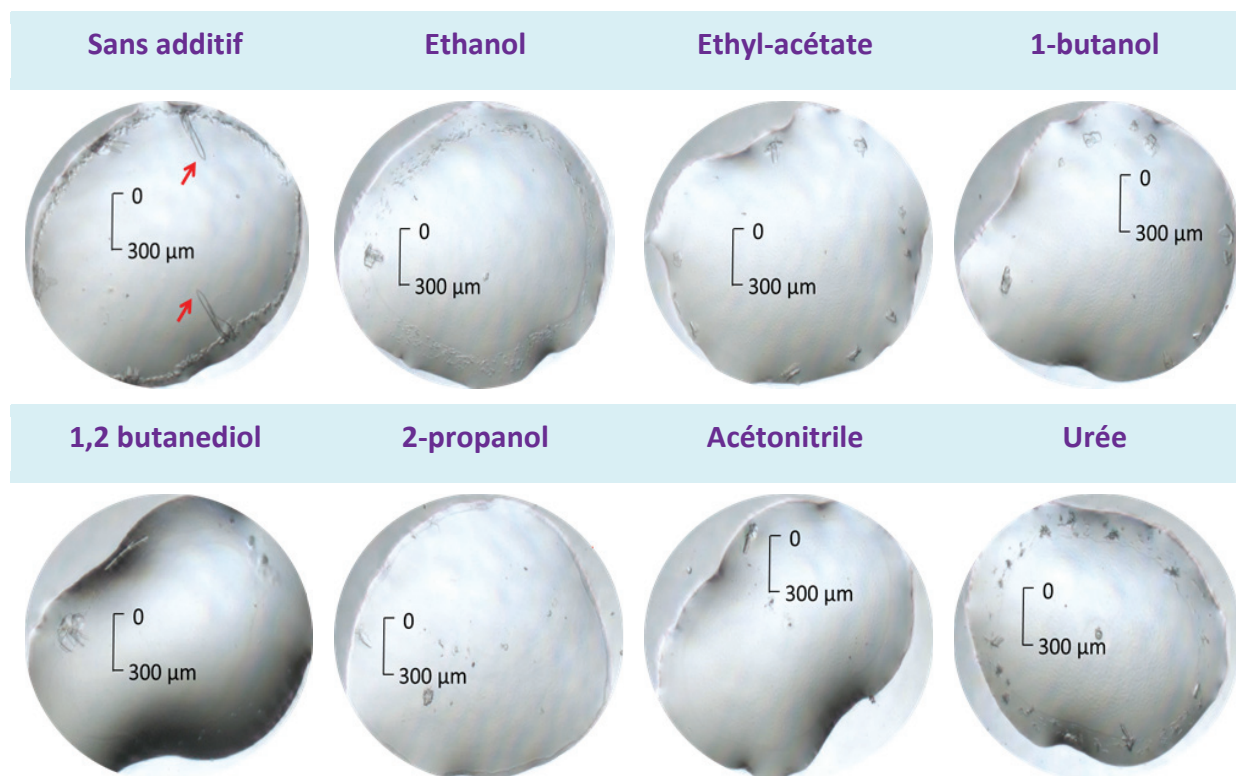
Cristaux obtenus à partir de la condition V avec des pH de 6,5, 6,8, 7 et 7,2. Les cristaux entourés par un cercle hachuré en rouge ont été testés à l'ESRF et le cliché de diffraction enregistré à 0°C est présenté dans la partie inférieure de la figure.

### e) Cristallisation en présence d'additifs

Une meilleure diffraction est indispensable pour déterminer la structure tridimensionnelle de BmrA. Ceci nous a donc conduit à utiliser des additifs afin d'améliorer la qualité et le pouvoir diffractant de ces cristaux. Les additifs de cristallisation utilisés sont des sels, des polymères, des détergents et des petites molécules organiques. Leur rôle est de destabiliser la couronne de détergent qui entoure la région membranaire afin de réduire sa taille et ainsi favoriser les contacts protéine-protéine (Deisenhofer et *al.*, 1985).

Nous avons testé l'ajout d'additifs sur la condition V grâce au kit Additive Screen d'Hampton Research qui contient des détergents, des sels, des agents chélatants, réducteurs et des solvants organiques. En absence d'additifs, nous obtenons des monocristaux de  $400 \times 100 \times 50 \mu\text{m}$  qui présentent un pouvoir diffractant compris entre 7 et 8 Å (figure 92). L'ajout d'additifs n'améliore pas la cristallisation de BmrA. En effet, la majorité des gouttes restent limpides, seuls quelques cristaux ont été obtenus en présence de solvants organiques comme l'éthanol ou le 1,2 butanediol. Mais leurs caractéristiques macroscopiques ne sont pas satisfaisantes, comme on peut le constater sur la figure 92.

Ce résultat était assez prévisible car comme nous l'avons vu précédemment BmrA cristallise dans une fenêtre très étroite comprise entre 38 et 40% PEG 200 et un ratio protéine-précipitant 2:1. Ainsi, le fait d'ajouter dans la goutte des additifs à 10% final dilue légèrement les concentrations en sel et précipitant. Pour compenser cet ajout, nous avons donc testé ce kit en nous plaçant cette fois-ci dans la condition : BmrA 7 mg/ml, 43% PEG 200, 0,4M KCl, 0,1M Pipes NaOH pH 7,0. Mais le résultat obtenu est le même, aucun de ces additifs n'améliore la cristallisation de BmrA.



### Figure 92 : Cristallisation de BmrA E504A en présence d'additifs.

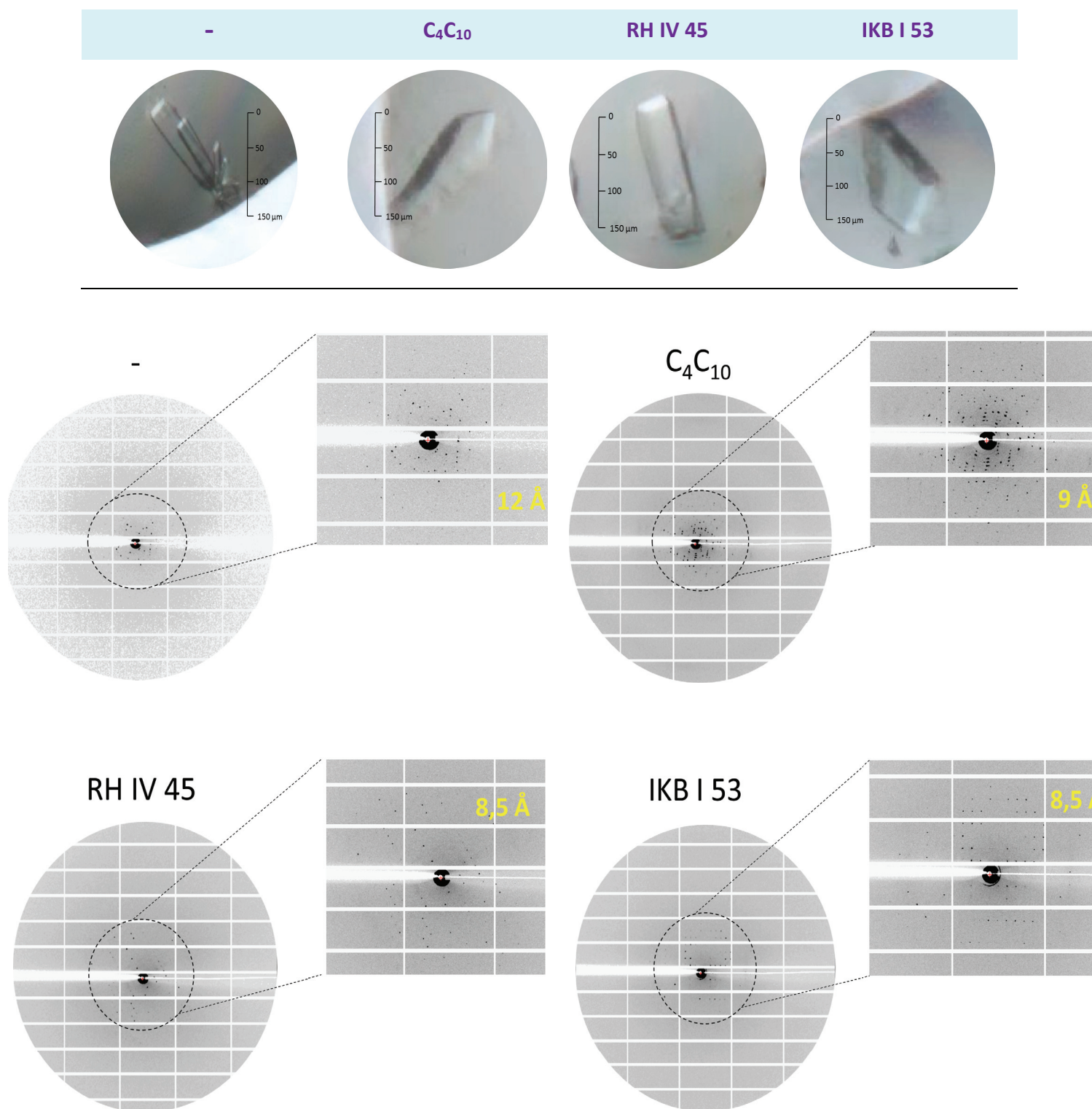
Cristaux obtenus dans la condition V en absence et présence d'additifs (éthanol, éthyl-acétate, 1-butanol, 1,2 butanediol, 2-propanol, acétonitrile, urée).

Dans une deuxième série d'essais, nous avons utilisé les calixarènes et les clamps, des détergents stabilisants développés au laboratoire (Matar et *al.*, 2011) comme additifs de cristallisation. Comme nous l'avons vu précédemment, l'ajout d'additif modifie la concentration des différents composés au sein de la goutte, ce qui empêche la cristallisation de BmrA. Pour pallier à ce problème, nous avons solubilisé chaque additif dans 38% PEG 200, 0,3M KCl et 0,1M Pipes NaOH pH 7,0. Les résultats obtenus sont cette fois-ci spectaculaires, comme on peut le constater sur la figure 93.

En absence d'additifs, les conditions standard de cristallisation de BmrA permettent d'obtenir en trois semaines des cristaux de 200 x 50 x 50  $\mu\text{m}$ . L'addition de C4C10, RH IV 45 et IKB I 53 a permis d'obtenir en une quinzaine de jours, dans les mêmes conditions, des cristaux de longueur identique mais qui semblent mieux formés et beaucoup plus épais. Ces cristaux très prometteurs ont donc été testés au synchrotron de l'ESRF sur la ligne microfocus ID23-2 et les clichés de diffractions générés sont présentés dans la figure 93.

En absence d'additifs, la résolution obtenue est de 12 Å mais la qualité des clichés est médiocre comme en témoigne la juxtaposition des taches de diffractions. L'utilisation d'additifs améliore la qualité des spots mais n'augmente pas le niveau de diffraction qui atteint 8,5 Å. Ce résultat est donc assez décevant compte tenu de l'amélioration spectaculaire des caractéristiques macroscopiques de ces cristaux. L'indexation des images à malgré tout confirmé que BmrA cristallise dans un groupe d'espace orthorombique.





**Figure 93 : Cristallisation de BmrA en présence de détergents calixarène et clamps.**

Cristaux obtenus dans la condition V en absence et présence de  $C_4C_{10}$ , RH IV 45 et IKB I 53. Ces quatre cristaux ont été testés à l'ESRF et leur cliché de diffraction enregistré à  $0^\circ$  est présenté dans la partie inférieure de la figure.

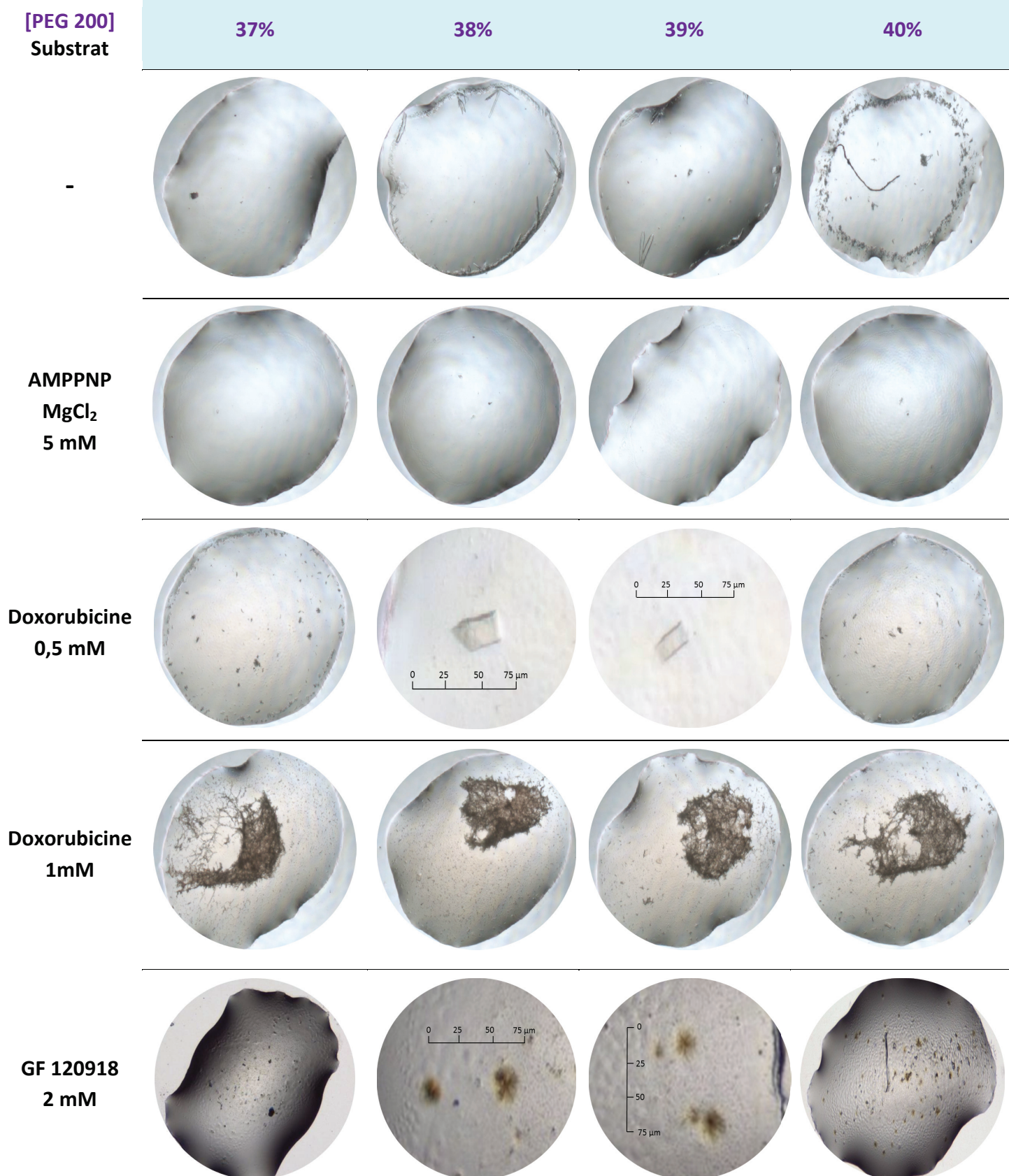
## f) Co-cristallisation en présence de substrats

Dans l'optique de stabiliser BmrA dans une conformation donnée et ainsi améliorer la diffraction, nous avons entrepris sa co-cristallisation en présence de substrats transportés (voir la partie matériel et méthodes) (doxorubicine, daunorubicine, Hoechst 33342, rhodamine, GF120918X et LY335579), de nucléotides (AMPPNP) et les isomères R et S de l'inhibiteur QZ59 avec lequel la structure de la P-gp a été résolue. Ces composés hydrophobes ont une forte affinité pour les TMDs de BmrA, comme par exemple le GF120918X avec un  $K_D$  de 440 nM.

En absence de substrats, nous sommes parvenus à reproduire avec 38 et 39% de PEG 200 des monocristaux de 400 x 100 x 50  $\mu\text{m}$ . En revanche, parmi tous les composés testés, aucun n'a amélioré la cristallisation de BmrA. En présence de nucléotides, BmrA ne cristallise plus et l'ensemble des gouttes obtenues sont limpides. L'utilisation de la doxorubicine à 500  $\mu\text{M}$  a permis d'obtenir des petits cristaux de 50 x 25 x 5  $\mu\text{m}$  non reproductibles. Dans les mêmes conditions, l'ajout de 2 mM de doxorubicine conduit à la précipitation de toutes les gouttes de cristallisation. Il est probable que les cristaux obtenus correspondent à la forme apo de BmrA et non à celle en complexe avec la doxorubicine. Enfin, en présence de GF120918X, nous sommes parvenus à obtenir de petits cristaux de couleur jaune en forme d'oursins. Mais avant d'aller plus loin dans l'optimisation, nous avons voulu vérifier que ces cristaux correspondaient bien à ceux de BmrA. Pour se faire, les mêmes conditions de cristallisation ont été reproduites, cette fois sans ajouter de protéine. Et les mêmes cristaux ont été obtenus. Il ne s'agit donc pas de cristaux de BmrA mais ceux du GF120918X.

Les essais réalisés jusqu'à maintenant en présence de substrats se sont donc montrés assez décevants. On peut supposer qu'en présence de nucléotides BmrA ne cristallise pas car la protéine se trouve dans une conformation outward facing, ce qui modifie les conditions nécessaires à sa cristallisation. En revanche, comme nous l'avons vu précédemment avec les structures de Art(QN)<sub>2</sub> et Atm1 résolues respectivement en complexe avec des aminoacides et du glutathion, la fixation de substrats au niveau des TMDs ne devrait pas modifier la conformation de la protéine qui devrait rester dans une forme inward facing. Il est donc surprenant que BmrA ne cristallise pas dans la condition V en présence de substrats.

Les futurs essais de cristallisation réalisés sur BmrA en présence de substrats devront donc s'attacher à déterminer de nouvelles conditions de cristallisation à l'aide des kits commerciaux classiques.



**Figure 94 : Cristallisation de BmrA E504A en présence de substrats.**



## Optimisation des conditions de purification pour la cristallisation de BmrA E504A

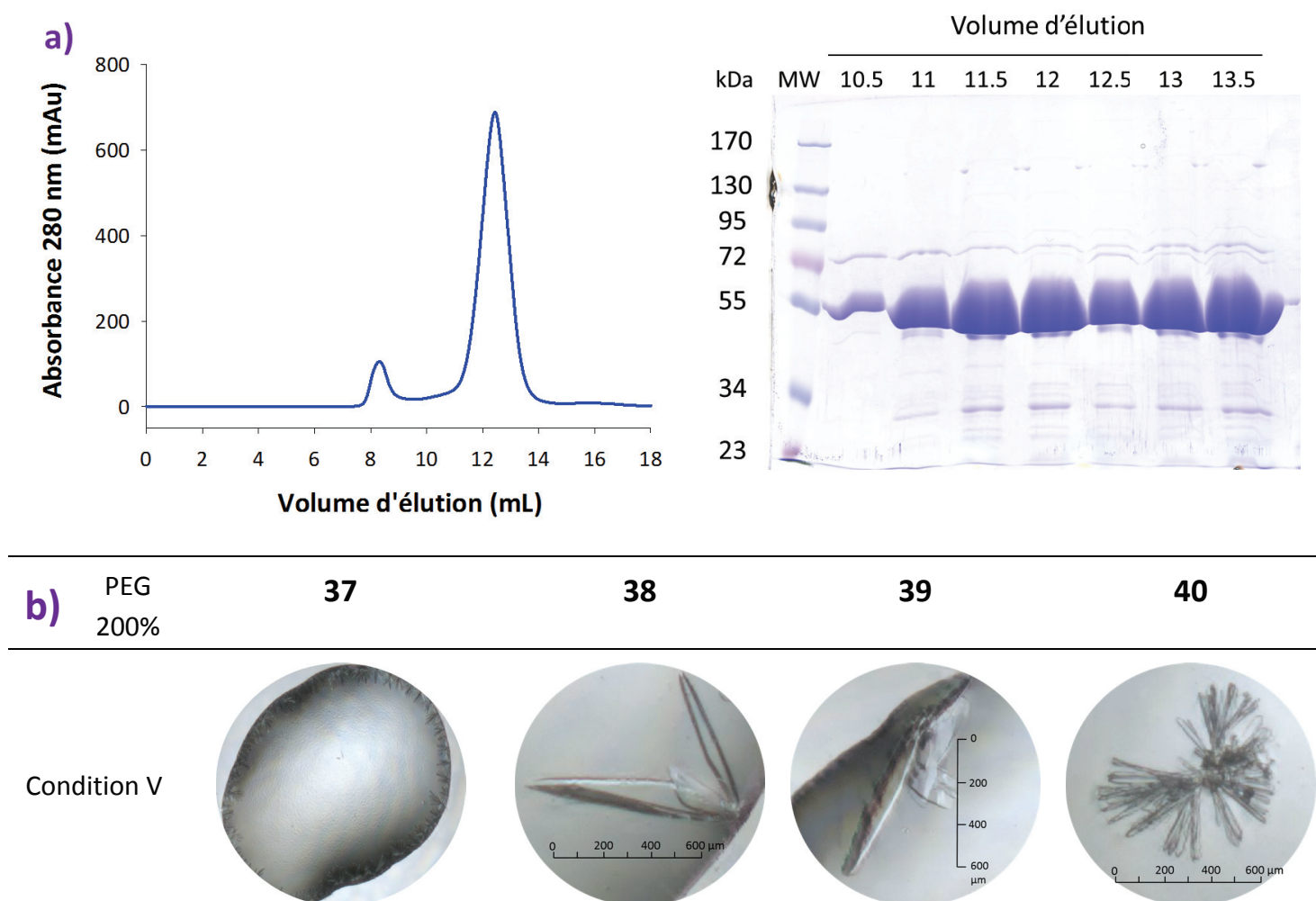
Conjointement aux essais de cristallisation, nous avons porté nos efforts sur l'étape de purification de la protéine afin d'affiner plusieurs paramètres pour améliorer la qualité de diffraction des cristaux.

### a) Influence du KCl

Par la force ionique qu'ils imposent, les sels jouent un rôle clé dans le processus de purification et de cristallisation des protéines. Ainsi, certains ions affectent plus que d'autres la stabilité et la solubilité des protéines. En 1888, Hofmeister a classé les ions suivant leur capacité à augmenter la solubilité et la stabilité des protéines en prenant pour exemple les protéines du blanc d'œuf de poule (Hofmeister, 1888). Les ions situés à gauche de la série, comme l'ammonium, le potassium, le sulfate ou encore le phosphate maintiennent la protéine sous forme native et diminuent sa solubilité favorisant ainsi la cristallisation.

En pratique, le chlorure de sodium est classiquement utilisé pour la purification des protéines. C'est d'ailleurs celui que nous avons employé dans le cadre de BmrA. Mais comme nous l'avons vu précédemment, le chlorure de potassium permet d'obtenir à 4°C des cristaux beaucoup plus gros par rapport au chlorure de sodium. Nous avons ainsi remplacé dans la purification de BmrA le NaCl par le KCl afin d'essayer d'améliorer l'aspect de ces cristaux.

BmrA E504A a été purifié en DDM-sodium cholate suivant le même protocole que celui décrit précédemment en remplaçant le NaCl par le KCl dans tous les tampons de purification. Après deux chromatographies d'affinité, BmrA est injecté sur une colonne d'exclusion Superdex 200. La protéine est éluée en un pic parfaitement symétrique, comme le montre la figure 95a. Le dépôt des fractions sur gel SDS-PAGE 10% indique la présence de l'ubiquinol oxydase, de l'arabinose transférase et de produits de dégradation de BmrA aux alentours de 34 kDa. On remarque à 72 kDa la présence d'une nouvelle bande contaminante. Les fractions correspondant au pic d'éluion ont été regroupées et l'échantillon a été concentré jusqu'à 15 mg/ml. Nous avons ensuite réalisé des essais de cristallisation autour de la condition V en faisant varier le PEG 200 de 35 à 45%. Comme avec le NaCl, BmrA cristallise en présence de 38 et 39% PEG 200. Les cristaux obtenus sont plus longs (environ 800  $\mu\text{m}$ ) mais ne paraissent pas plus épais (100  $\mu\text{m}$ ). Le changement de sel dans la purification de BmrA ne semble donc pas avoir amélioré les caractéristiques macroscopiques. Pour l'instant, nous n'avons pas encore testé la diffraction de ces cristaux.



**Figure 95 : Effet du chlorure de potassium sur la purification et la cristallisation de BmrA E504A.**

A) Chromatogramme et gel SDS-PAGE 10% des fractions du pic principal obtenu lors de la chromatographie d'exclusion diffusion. B) Cristallisation de BmrA à 4°C autour de la condition V en faisant varier le PEG 200 de 35 à 45%.

### **b) Influence du triton X-100 et du sodium cholate sur la cristallisation de BmrA**

Comme nous l'avons vu en début de partie, le choix du détergent est critique pour la purification et la cristallisation des protéines membranaires.

A ce stade, pour parvenir à cristalliser BmrA, nous avons dû extraire la protéine avec un détergent non ionique, le triton X-100 et ensuite l'échanger sur colonne d'affinité au nickel contre des micelles mixtes de DDM-sodium cholate. La question qui se pose est pourquoi BmrA cristallise dans ces conditions et non lorsque la protéine est purifiée en présence de DDM ou LMNG seuls ? Afin d'améliorer l'aspect des cristaux et évaluer de façon séparée l'influence du triton, du DDM et du cholate, nous avons extrait et purifié BmrA dans différents détergents comme indiqué sur la figure 96, pour ensuite réaliser des essais de cristallisation autour de la condition V en faisant varier le PEG 200 de 35 à 45%.

Nous sommes parvenus à reproduire avec les conditions classiques de purification, des monocristaux de  $600 \times 200 \times 50 \mu\text{m}$  (figure 96 a) qui diffractent jusqu'à  $7 \text{ \AA}$  de résolution. Pour déterminer l'influence du sodium cholate, nous avons extrait BmrA en triton et l'avons ensuite échangé contre du DDM seul ou du DDM-chaps. La figure 96 (c et d) montre qu'en présence de DDM-chaps, les gouttes restent limpides et qu'avec le DDM, nous obtenons des microcristaux de  $40 \times 40 \mu\text{m}$  en forme d'étoiles qui ne diffractent pas les rayons X. Ceci suggère que le sodium cholate est indispensable à la cristallisation de BmrA.

Afin d'évaluer l'influence du triton sur le processus de cristallisation, nous avons extrait la protéine en DDM et l'avons ensuite purifié en DDM-cholate ou DDM seul. La figure 96 (e et f) montre qu'en présence de DDM-cholate, nous obtenons des cristaux en forme d'oursins de  $200 \times 150 \mu\text{m}$  qui diffractent à seulement  $22 \text{ \AA}$  de résolution. Ceci démontre que le triton améliore également la morphologie et la qualité de diffraction des cristaux.

Enfin, pour tester l'influence du DDM, nous avons extrait BmrA en triton et l'avons ensuite échangé contre du LMNG-cholate. Nous avons obtenu des monocristaux de  $500 \times 150 \times 50 \mu\text{m}$ , comme ceux de la figure 96 b. On peut donc en déduire que le DDM n'est pas critique pour la cristallisation de BmrA. Les cristaux obtenus en LMNG-cholate sont très prometteurs et n'ont pas encore été testés à l'ESRF.



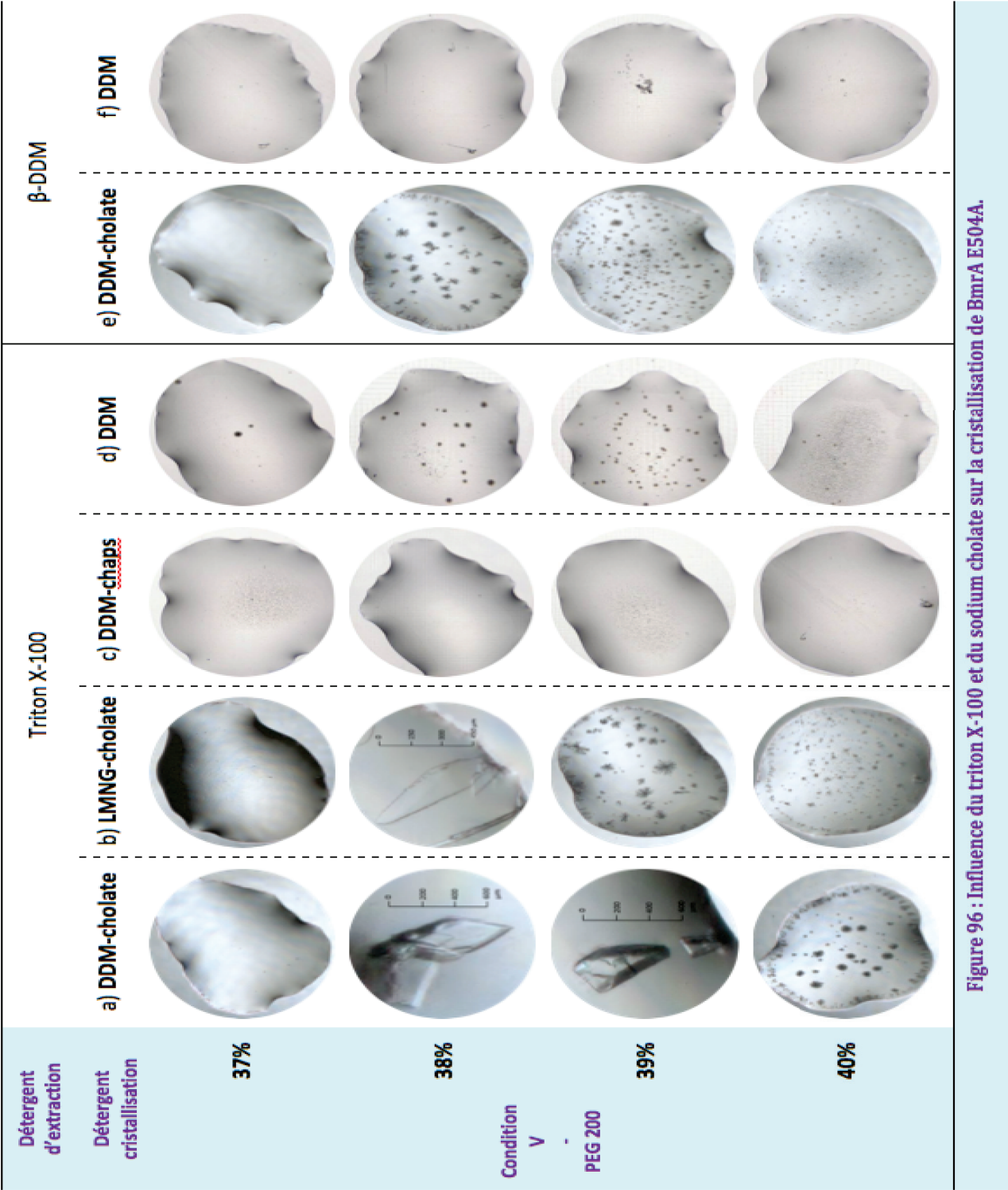


Figure 96 : Influence du triton X-100 et du sodium cholate sur la cristallisation de BmrA E504A.

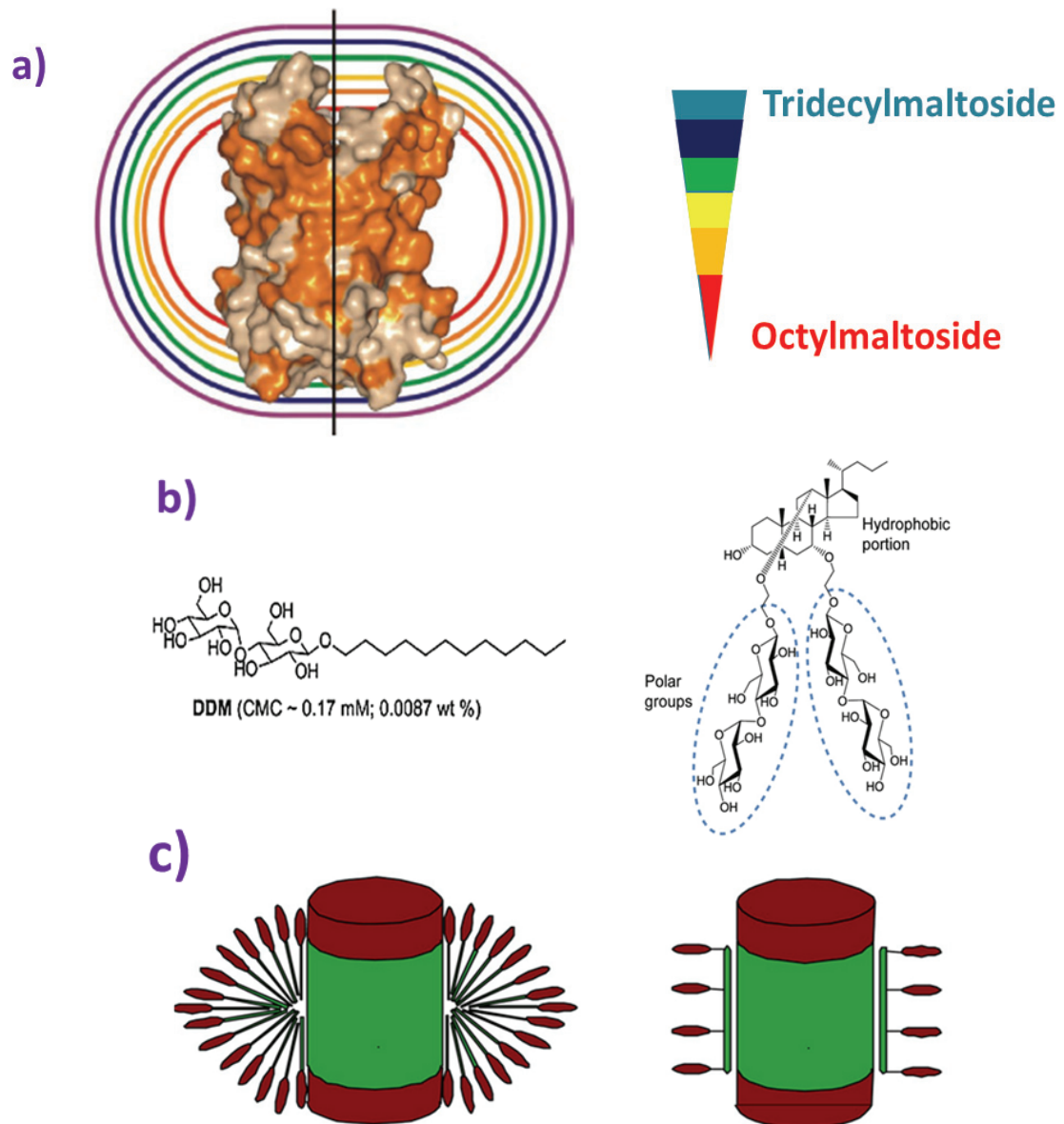
## C. DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble des essais que nous avons réalisé (criblage préliminaire et optimisation) représente des milliers de conditions testées. Des cristaux de protéine correspondant à BmrA ont pu être obtenus de manière reproductible et les étapes d'optimisation nous ont permis d'améliorer leur taille et leur morphologie. A ce stade, la condition V nous a permis d'obtenir des monocristaux de  $500 \times 150 \times 50 \mu\text{m}$  qui diffractent jusqu'à  $7 \text{ \AA}$  de résolution. Nous avons montré que BmrA cristallise dans le groupe d'espace orthorombique  $P2_12_12_1$  avec les paramètres de maille suivants :  $a = 96 \text{ \AA}$  ;  $b = 99 \text{ \AA}$  ;  $c = 238 \text{ \AA}$  ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Ces résultats constituent une avancée significative mais restent encore insuffisants pour déterminer la structure de BmrA. Il nous faudrait pour cela atteindre une résolution inférieure à  $4 \text{ \AA}$ . La question est donc de savoir comment nous pourrions améliorer le pouvoir diffractant de ces cristaux ?

Nous avons vu précédemment que lorsque nous purifions BmrA en DDM ou LMNG, aucun cristal de protéine n'est obtenu. Le principal inconvénient de ces détergents est la grande taille de leur micelle, qui empêche probablement la formation des contacts protéine-protéine (Bill et *al.*, 2011). Sonoda et ses collaborateurs ont montré en 2010 que la résolution moyenne des structures de protéine membranaire cristallisées en DDM est parmi les plus faibles, aux alentours de  $4 \text{ \AA}$  (Sonoda et *al.*, 2010). A l'inverse, les détergents possédant une chaîne alkyle courte comme l'octyl ou le nonyl glucoside permettent d'obtenir la meilleure résolution moyenne (environ  $2 \text{ \AA}$ ). Ces détergents qui disposent d'une petite micelle permettent à la protéine d'exposer une surface hydrophile plus importante, ce qui favorise la formation des contacts cristallins et une diffraction à plus haute résolution. Ceci est illustré dans la figure 96a avec le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP pour lequel les dimensions de la ceinture de plusieurs détergents ont été estimées (Bill et *al.*, 2011).

Dans le cas de BmrA, nous avons démontré que le sodium cholate joue un rôle déterminant dans la cristallisation de la protéine. Varade et ses collaborateurs ont montré en 2004 que l'ajout de sodium cholate à des détergents cationiques réduit la CMC et le nombre d'agrégation de ces surfactants (nombre moyen de molécules de détergent formant une micelle), ce qui permet d'obtenir une micelle mixte de plus petite taille (Varade et *al.*, 2004). Ceci explique donc pourquoi les micelles mixtes de DDM- et LMNG-sodium cholate favorisent la cristallisation de BmrA. La taille du complexe protéine-détergent ainsi formé est plus petite qu'en présence de DDM ou LMNG seuls. Afin d'améliorer la diffraction des cristaux de BmrA, il serait donc intéressant de tester l'influence de détergents comme le undécyl-, décyl- ou nonyl-maltoside pour réduire encore davantage la taille de la ceinture de détergent du complexe protéine-détergent et ainsi favoriser les interactions protéine-protéine.

En 2013, Zhang et ses collaborateurs ont développé une nouvelle classe de détergents appelés amphiphiles faciaux (FA) dont la structure, présentée dans la figure 97b, est construite autour d'une molécule de cholate pour apporter l'hydrophobie et deux molécules de



**Figure 97 : Stratégies pour améliorer la cristallisation de BmrA E504A.**

D'après Bill et *al.*, 2011; Lee et *al.*, 2013.

A) Estimation de la taille relative des micelles de détergent autour du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP (30 kDa). La protéine a été purifiée en détergents maltosides avec des chaînes alkyles de 13 (pourpre) à 8 (rouge) atomes de carbone. Les dimensions des micelles ont été estimées à partir du rayon de stokes des micelles libres et des complexes protéine-détergent déterminés par chromatographie d'exclusion diffusion. B) Structures chimiques du DDM et des amphiphiles faciaux dérivés du cholate. C) Les différents modes d'interaction protéine-détergent. A gauche les détergents conventionnels et à droite les amphiphiles faciaux. Ces derniers recouvrent une surface hydrophobe plus importante et permettent de réduire la taille de la ceinture de détergent du complexe protéine-détergent.

maltose qui assurent l'hydrophilie (Lee et *al.*, 2013). Comme illustré dans la figure 97c, ces détergents couvrent une surface hydrophobe plus importante et forment des micelles de

plus petite taille par rapport aux détergents conventionnels comme le DDM, ce qui permet la formation de complexes protéine-détergent plus stables et donc plus favorables à l'empilement cristallin (Kang et *al.*, 2013). Il a été montré, pour le transporteur ABC MsbA, que la taille du complexe protéine-détergent formée avec les amphiphiles faciaux est cinq fois plus petite que celle obtenue en présence de DDM ou UDM (Zhang et *al.*, 2007; Lee et *al.*, 2013). L'activité de MsbA purifié en FA et en micelles mixtes FA-UDM est respectivement quatre et trois fois plus élevée que lorsque la protéine est obtenue en DDM ou UDM seuls. Enfin, l'utilisation de ces détergents comme additifs de cristallisation a permis de résoudre la structure du transporteur MATE NorM (He et *al.*, 2011) et d'améliorer la diffraction des cristaux de MsbA jusqu'à 4 Å de résolution, contre 6 Å pour ceux obtenus en présence de DDM. Il sera donc particulièrement intéressant de tester l'influence de ces détergents sur la cristallisation de BmrA.

Plusieurs autres méthodes peuvent être envisagées pour améliorer les propriétés des cristaux de BmrA.

L'utilisation de nanoanticorps permet d'exposer davantage de surface hydrophile et ainsi de favoriser les contacts protéine-protéine au profit des interactions protéine-détergent (Griffin et Lawson, 2011). Cette méthode a permis de résoudre notamment les structures de P-gp de souris (Ward et *al.*, 2013) et de plusieurs cytochromes (Ostermeier et *al.*, 1995; Hunte et *al.*, 2000).

Les profils des taches de diffraction et la limite de diffraction des cristaux peuvent souvent être améliorés par déshydratation (Kuo et *al.*, 2003; Sharpe et *al.*, 2005; Russo Krauss et *al.*, 2012; ). Cette technique consiste à transférer un cristal dans une goutte plus concentrée en précipitant et de la mettre à équilibrer au dessus d'un réservoir qui contient la même solution de déshydratation (Heras et *al.*, 2003). Le précipitant entre en compétition avec la protéine pour établir des liaisons hydrogènes avec l'eau, ce qui permet de réduire la quantité de solvant à l'intérieur des cristaux et d'augmenter l'ordre cristallin.

La protéolyse ménagée couplée à la spectrométrie de masse constitue une autre alternative intéressante puisque cette méthode permet d'identifier les parties stables d'une protéine, plus favorables à la cristallisation (Wernimont et *al.*, 2009). Une fois clonées, ces différentes régions peuvent être exprimées, purifiées puis cristallisées plus facilement. McPherson et ses collaborateurs sont parvenus à améliorer le pouvoir diffractant des cristaux de la sous unité  $\beta$  de l'hormone lutéinisante (LH) en ajoutant directement aux essais de cristallisation des protéases à l'état de trace (McPherson et *al.*, 2004).

En définitive, l'ensemble de ces travaux apparaît encourageant et indiquent que nous sommes sur la bonne voie pour réussir à résoudre la structure tridimensionnelle de BmrA à court terme.

**CHAPITRE 3 :**

**UNE NOUVELLE METHODE DE QUANTIFICATION  
DES DETERGENTS PAR SPECTROMETRIE DE  
MASSE DE TYPE MALDI**



Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le choix du détergent est critique pour l'étude structurale des protéines membranaires. Son influence débute dès l'étape de solubilisation où il doit extraire une protéine soluble, active et stable en solution et se termine à la cristallisation, où il doit former avec la protéine un complexe de petite taille pour favoriser les interactions protéine-protéine. Plusieurs études démontrent en effet qu'il existe une corrélation inverse entre la quantité de détergent et la cristallisation des protéines membranaires (Dahout-Gonzalez et *al.*, 2003 ; Wiener et *al.*, 2004).

Or, la concentration réelle de détergent (libre et associée à la protéine) ainsi que la composition (en cas de mélange de détergents) sont des paramètres difficiles à contrôler et à quantifier lors du processus d'extraction/purification car ils sont modulés par plusieurs facteurs comme la concentration en protéine, la nature des sels et le pH. De même, certaines étapes chromatographiques comme l'échange de détergent et l'ultrafiltration modifient cette concentration dans des proportions qu'il n'est pas possible d'évaluer sans une quantification directe et réalisable en routine. Aucune des méthodes de dosage développées jusqu'à maintenant (cf partie bibliographique) ne permet de doser un détergent quelconque (que ce soit seul ou en mélange), en routine et rapidement.

Le chapitre 3 sera donc consacré à la nouvelle méthode de quantification des détergents que nous avons développé au laboratoire. Elle est basée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI (matrix-assisted UV-laser desorption ionization mass spectrometry) qui est utilisée en routine dans tous les plateaux techniques de protéomique. Elle utilise des standards qui sont soit des équivalents deutérés soit des molécules structurellement proches : en mélangeant l'un ou l'autre aux solutions contenant les détergents correspondants, on mesure le rapport des deux espèces ce qui donne accès à la mesure recherchée. Cette méthode, à la fois simple et rapide, est comme nous le verrons compatible avec la quasi-totalité des détergents et des protéines membranaires. Elle nous a ainsi permis d'estimer la taille de la ceinture de détergent associée à BmrA et d'apporter de nouvelles informations sur le comportement des complexes protéine-détergent en solution.

## A. MATERIEL ET METHODES

### Matériel

Les détergents protonés et deutérés utilisés lors de cette étude proviennent du fournisseur Anatrace : FC12<sup>H</sup> (F308), FC12<sup>D</sup> (F308D), DDM<sup>H</sup> (D310), DDM<sup>D</sup> (D310T), OG<sup>H</sup> (O311), OG<sup>D</sup> (O311D) ainsi que le LMNG (NG310), DMNG (NG322), CHAPS (C316) et CHAPSO (C317). Les détergents calixarènes C<sub>4</sub>C<sub>10</sub> et C<sub>4</sub>C<sub>12</sub> ont été fournis par la société Calixar. Les autres composés proviennent de Sigma.

### Dosage des détergents seuls

⊕ **Appareil :** Les spectres sont obtenus sur un appareil Voyager DE-STR (AB Sciex) en mode reflectron. La longueur d'onde du laser est de 337 nm et la tension d'accélération de 5000 V.

⊕ **Protocole :** Les détergents protonés et deutérés sont préparés à 20 g/L dans l'eau en pesant les volumes pour gagner en précision. Les deux solutions sont mixées en rapport 1/3, 1 et 3, avec une concentration de détergent deutéré constante de 1 g/L et celle de détergent protoné de 0, 0,3, 1 et 3 g/L.

Un microlitre de la solution contenant le détergent est mélangé avec 9 µl de solution de matrice. Celle-ci est optimisée pour chaque détergent : le 2,5-Dihydroxybenzoate (DHB) à une concentration de 10 g/l dans l'eau pour le DDM, le  $\beta$ -OG et le CHAPS, l'acide  $\alpha$ -cyano hydroxycanimmique (CHCA) préparé à 10 g/l dans un mélange acétonitrile:eau 50:50 pour la FC12 et le  $C_4C_{10}/C_4C_{12}$ , le 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (THAP) à 10 g/l dans un mélange acétonitrile:eau 30:70 pour le LMNG/DMNG et le 9-Aminoacridine à 10 g/l dans un mélange acétone:méthanol 50:50 pour le CHAPS/CHAPSO.

Un microlitre du mélange est déposé sur la cible et cristallisé à température et pression ambiante. Pour chaque essai, le spectre obtenu résulte de l'accumulation de trois séries de mesures indépendantes acquises dans trois zones différentes du dépôt. Chaque série correspond au cumul des données de 300 tirs laser. Les échantillons contenant de fortes concentrations en imidazole ont été dilués dix fois avant d'ajouter la matrice. Pour les échantillons contenant du DMNG/LMNG, 1 µl de tétrahydrofurane est ajouté sur les spots pour obtenir des dépôts plus homogènes. La validation de la méthode pour chaque détergent a été réalisée en déposant le même jour trois échantillons identiques préparés indépendamment (répétabilité) et sur trois jours distincts (reproductibilité).

### Calcul du ratio MALDI-MS détergent protoné/standard

Afin de doser la quantité de détergent présente au sein de l'échantillon, nous devons tout d'abord déterminer le rapport entre l'intensité de l'ion moléculaire du détergent protoné et celle de l'ion moléculaire correspondant à sa version deutérée ou au standard structuralement proche. La concentration de détergent est ensuite calculée à partir de la courbe étalon établie entre le ratio H/D (axe des ordonnées) et la concentration de détergent protonné (axe des abscisses).

Sur un spectre MALDI-MS, une molécule de formule brute  $C_wO_xH_yN_z$  est détectée au niveau de son rapport  $m/z$  par un pic principal contenant les éléments sous leur forme isotopique la plus abondante ( $^{12}C$ ,  $^{14}N$ ,  $^{16}O$ ,  $^1H$ ) et par deux autres pics moins intenses ( $m/z+1$  et  $m/z+2$ ) contenant les éléments présents sous forme isotopique moins abondante comme le  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ,  $^{18}O$  ou  $^2D$ . Ce phénomène qui correspond à la contribution isotopique de chaque élément est pris en compte dans le calcul du ratio H/D.

Dans le cas des standards non deutérés, seules les intensités du pic principal sont prises en compte pour le calcul car la contribution isotopique  $m/z+1$  et  $m/z+2$  est négligeable.

Dans le cas des détergents deutérés, on observe, en plus de la distribution isotopique, la présence d'ions satellites à -1 et -2  $m/z$  du pic de l'ion moléculaire ( $m/z$  388.3 et 389.3 pour la FC12 ( $m/z$  390.3), 556.3 et 557.3 pour le DDM ( $m/z$  558.3), 337.2 et 338.2 pour le  $\beta$ -OG ( $m/z$  339.2)). Ces ions correspondent à l'échange d'un ou deux atomes de deutérium par des hydrogènes au cours de l'étape de préparation du MALDI. La contribution isotopique de ces

ions est prise en compte pour ne pas sous-estimer le ratio H/D. Comme détaillé dans la figure 98c, en considérant un détergent avec un ratio  $m/z = P$ , nous devons tout d'abord calculer l'abondance corrigée de  $P'$  en éliminant la contribution isotopique de  $P''+1$  et de  $P$  en supprimant les contributions de  $P'+1$  et  $P''+2$ . L'abondance réelle du détergent deutéré peut ensuite être obtenue en additionnant les abondances corrigées de  $P$ ,  $P'$  et  $P''$ .

a)

Détergent	Formule	m/z	Standard	Formule	m/z	Ratio
C4C10	$C_{44}H_{49}O_{10}Na$	760.3 ( $M^+$ )	C4C12	$C_{46}H_{53}O_{10}Na$	788.3 ( $M^+$ )	$A_{760}/A_{788}$
LMNG	$C_{47}H_{88}O_{22}$	1027.6 ( $MNa^+$ )	DMNG	$C_{43}H_{80}O_{22}$	971.6 ( $MNa^+$ )	$A_{1027}/A_{971}$
CHAPS	$C_{32}H_{58}N_2O_7S$	637.4 ( $MNa^+$ )	CHAPSO	$C_{32}H_{58}N_2O_8S$	653.4 ( $MNa^+$ )	$A_{637}/A_{653}$

b)

Détergent	Formule	m/z	Standard deutéré	m/z (deuté)	$x_{M+1}$	$x_{M+2}$	Ratio
FC12	$C_{17}H_{38}N_1O_4P$	352.3 ( $M^+$ )	FC12 <sup>D</sup>	390.3 ( $M^+$ )	0.206	0.028	$A_{352}/A_{390real}$
DDM	$C_{24}H_{46}O_{11}$	533.3 ( $MNa^+$ )	DDM <sup>D</sup>	558.3 ( $MNa^+$ )	0.282	0.060	$A_{533}/A_{558real}$
OG	$C_{14}H_{28}O_6$	315.2 ( $MNa^+$ )	OG <sup>D</sup>	339.2 ( $MNa^+$ )	0.166	0.025	$A_{315}/A_{339real}$

c)

$$A(P) = A(P)_{cor} + A(P')_{cor} + A(P'')_{exp} \quad (\text{eq. 1})$$

$$A(P)_{cor} = A(P)_{exp} - A(P'+1)_{cal} - A(P''+2)_{cal} \quad (\text{eq. 2})$$

$$A(P'+1)_{cal} = [A(P')_{exp} - A(P''+1)_{cal}] * x_{M+1} \quad (\text{eq. 2.1})$$

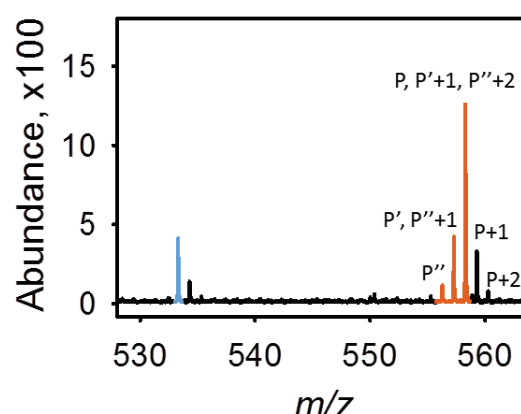
$$A(P''+2)_{cal} = A(P'')_{exp} * x_{M+2} \quad (\text{eq. 2.2})$$

$$A(P')_{cor} = A(P')_{exp} - A(P''+1)_{cal} \quad (\text{eq. 3})$$

$$A(P''+1)_{cal} = A(P'')_{exp} * x_{M+1} \quad (\text{eq. 3.1})$$

d)

Détergents deutérés	Eq.	Equation expérimentale
FC12	1.1	$A(390)_{exp} + 0.794 * A(389)_{exp} + 0.808 * A(388)_{exp}$
DDM	1.2	$A(558)_{exp} + 0.718 * A(557)_{exp} + 0.737 * A(556)_{exp}$
OG	1.3	$A(339)_{exp} + 0.834 * A(338)_{exp} + 0.837 * A(337)_{exp}$



**Figure 98 : Calcul du ratio MALDI-MS détergent protoné/standard.**

Caractéristiques des détergents non deutérés (A) et deutérés (B) utilisés lors de cette étude. M = masse, A = abondance absolue de l'ion moléculaire et du standard. Les abondances relatives  $x_{M+1}$  et  $x_{M+2}$  sont normalisées par rapport à 1. C) Equation (eq. 1) utilisée pour le calcul de l'abondance corrigée du détergent deutéré, A(P), qui prend en compte la contribution isotopique des éléments moins abondants ( $x_{M+1}$  et  $x_{M+2}$ ) et la présence de deux ions satellites dû à l'échange hydrogène-deutérium (P, P', P''). Un exemple de spectre est donné sur la droite avec la FC12 deutérée. D) Equations expérimentales obtenues à partir de Eq. 1 pour chaque détergent deutéré.

### Limite de détection du DDM et de la FC12

Des solutions de FC12<sup>H</sup> ou DDM<sup>H</sup> préparées respectivement à 0,02% et 0,2% sont mélangées avec leur version deutérée de façon à obtenir un ratio H/D de 0,9 pour le DDM et 1,1 pour la FC12. Ces solutions sont ensuite diluées 10, 100 et 1000X pour le DDM et 10, 100 et 500X pour la FC12. La quantité de FC12<sup>H</sup> et de DDM<sup>H</sup>, présente dans chaque solution, est ensuite dosée par MALDI MS

### Dosage de la FC12 et du DDM après dialyse

BmrA est exprimé comme décrit dans la partie matériel et méthodes du chapitre précédent puis est extrait de sa fraction membranaire à 5 g/L avec 10 g/L de DDM puis centrifugé. La fraction non extraite qui contient environ 50% de la protéine est soumise au même traitement avec 10 g/L de FC12. BmrA est ensuite purifiée par chromatographie d'échange d'ions, affinité et gel filtration en utilisant 3 g/L de DDM ou FC12 en fonction du détergent utilisé lors de l'extraction. Cent microgrammes de BmrA de chaque pool issu de la gel filtration en solution dans 0,02 M tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl, 3 g/L de détergent (FC12 ou DDM) est mixé avec 100 µL de 20 g/L de lipides (total extract, Avanti Polar) en solution dans 0,05 M tris-HCl pH 8,0, 20 g/L DDM, qsp 500 µL H<sub>2</sub>O. Chaque solution est déposée dans un boudin de dialyse de seuil de perméabilité de 10 000 daltons et dialysée 2x24 h à 4°C contre 0.5 L de tampon 0,02 M tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl. Les concentrations de détergents sont dosées dans les solutions de protéine avant addition de lipides et après dialyse, comme décrit précédemment en ajoutant 1 g/L de détergent deutéré.

### Dosage du DDM et du β-OG mélangés

Des solutions de β-OG protonné et deutéré ont été mélangées à un ratio 1:1 dans l'eau, à des concentrations finales de 0,01%, 0,03%, 0,1%, 0,3% et 1%. Le DDM protonné et deutéré ont préalablement été ajoutés à 0,1% finale dans toutes les solutions. Le DDM<sup>H</sup> et le β-OG<sup>H</sup> ont ensuite été dosés par MALDI MS.

### Estimation de la concentration de cholate

Des solutions de cholate à 0,015%, 0,05%, 0,1% et 0,15% sont préparées dans 20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl (tampon d'exclusion diffusion de la mP-gp). Chaque solution est ensuite diluée 2, 4 et 8 fois dans l'eau puis mélangée dans un ratio 1:1 avec le 9-aminoacridine (à 10 g/l dans du méthanol). Le pic de désorption du cholate, attendu à un ratio m/z de 407, est détecté au dessus du niveau du bruit de fond seulement pour certaines concentrations de NaCl et de cholate. Les échantillons de mP-gp purifiés en DDM-cholate ont été traités de façon similaire et les profils de désorption du cholate obtenus sont comparés à ceux du standard pour estimer la concentration de cholate.

### Dosage de la FC12 après concentration par ultrafiltration

Deux solutions de FC12 protonné et deutéré sont préparées à 1% (w/v) dans l'eau et mélangées pour constituer deux solutions contenant 0,1 et 0,3% de FC12<sup>H</sup> avec dans chacune 0,1% de FC12<sup>D</sup> dans 0,02 M Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl. 2 à 5 millilitres de ces solutions sont déposées sur membrane d'ultrafiltration, soit en cellulose régénérée avec un seuil de filtration de 3 000 daltons (Cellulose 3K, Amicon Ultra UFC500324, Millipore) et 100 000

daltons (Cellulose 100K, Amicon Ultra UFC910096, Millipore), soit en polyéthersulfone avec un seuil de filtration de 100 000 daltons (PES 100K, Spin-X UF 431486, Corning) et concentrés 25 fois (cellulose 3K) et 50 fois (cellulose et PES 100K) par centrifugation à 5 000g. La FC12<sup>H</sup> est dosée selon le protocole décrit précédemment, dans la solution initiale, la solution retenue et celle qui est filtrée dans ces conditions.

### Incubation de la FC12 avec la BSA

L'albumine de sérum bovin (BSA, MW : 65,5 kDa, Euromedex) est incubée à 1 ou 30 mg/ml (préparée dans l'eau) avec 0,1% de FC12 pendant 30 minutes à température ambiante. La FC12 deutérée est ensuite ajoutée à un ratio final de 1:1 et la quantité de foscholine présente dans l'échantillon est dosée par MALDI MS comme décrit précédemment. Comme contrôle, la même expérience est réalisée en remplaçant la BSA par de l'eau.

### Dosage de détergents liés à différentes protéines membranaires

⊕ **BmrA** : L'expression et la purification de BmrA sont décrites dans Matar et *al.*, 2011. Brièvement, la protéine BmrA a été extraite en mixant à 2 g/L de fraction membranaire 10 g/L de FC12 pendant 2h à 4°C suivit d'une centrifugation à 100 000xg pendant 1 heure. Le surnageant est soumis à une chromatographie d'échange d'ions (Q-sépharose, 5 ml, GE Healthcare) suivie d'une chromatographie d'affinité métal (Ni-Hitrap, 5 ml, GE healthcare) et le pool résultant de BmrA (5 mg/6 mL de tampon 0,02 M tris-HCl pH 8,0, 0,2 M NaCl, 0,18M imidazole, 3 g/L FC12) est concentré jusqu'à 1 mL sur membrane d'ultrafiltration 50K polyéthersulfone CORNING. La fraction concentrée est ensuite déposée sur colonne de gel filtration de type Superdex S200 10-300, 24 mL (GE Healthcare), avec comme phase mobile du tampon 0,02 M tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl, 3 g/L FC12. Les mêmes étapes chromatographiques d'affinité, concentration et gel filtration sont réalisées dans les mêmes conditions en absence de protéine. L'éluat issu des chromatographies d'exclusion est collecté en fractions de 0,5 mL dans lesquelles sont dosées d'une part les protéines à 280 nm (nanodrop 2000 spectrophotometer, thermoscientific), et d'autre part la FC12 par MALDI MS en ajoutant 0,1% de FC12<sup>D</sup> à chaque fraction et mesurant le rapport FC12<sup>H</sup>/FC12<sup>D</sup>, rapporté à la gamme étalon obtenue.

BmrA a également été extrait et purifié en DDM et LMNG de la même manière, en utilisant 1% de détergent au cours de l'extraction et 0,05% de DDM et LMNG lors de la chromatographie d'affinité. Le pool résultant de BmrA a ensuite été concentré sur 50 kDa jusqu'à 500 µl puis injecté sur colonne Superdex 200 avec comme phase mobile du tampon composé de 50 mM Hepes pH 8,0, 100 mM NaCl et 0,02% DDM ou 0,05% LMNG. En parallèle, la même étape de concentration est réalisée dans les mêmes conditions en absence de protéine puis l'échantillon est injecté sur colonne de gel filtration. Dans les deux cas, les fractions sont collectées par aliquots de 500 µl. La concentration de BmrA est déterminée au nanodrop et le détergent est dosé par MALDI MS en ajoutant 0,1% DDM<sup>D</sup> ou 0,1% DMNG comme standard interne.

⊕ **OprM** (une protéine du système d'efflux MexA-B/OprM de *Pseudomonas aeruginosa*) : OprM est munie d'une agrafe hexahistidine et produite dans *Escherichia coli* et purifiée



comme décrit dans Broutin et *al.*, 2005. L'échantillon utilisé a été fourni par le Dr. Martin Picard (Paris V). La protéine extraite à l'aide d'octyl  $\beta$ -D glucopyranoside ( $\beta$ -OG) puis purifiée par chromatographie d'affinité métal dans du tampon 0,02 M tris-HCl pH 8,0, 10% glycérol, 9 g/L de  $\beta$ -OG et 0,25 M imidazole. Le  $\beta$ -OG est dosé par MALDI MS en ajoutant 1g/L de  $\beta$ -OG<sup>D</sup> comme standard interne. La purification d'OprM en DDM s'est déroulée de la même manière; les membranes ont été solubilisées dans 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10% glycérol, 2% DDM puis purifié par chromatographie d'affinité. Le pool résultant d'OprM a été concentré sur 100 kDa et injecté sur colonne Superdex 200 avec comme phase mobile du tampon 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10% glycérol et 0,05% DDM. Le DDM est ensuite dosé par MALDI MS en ajoutant 0,1% de DDM<sup>D</sup>.

⊕ **P-gp (*Mus musculus*)** : P-gp a été purifié comme décrit dans Ward et *al.* (2013). Après chromatographie d'exclusion diffusion, le pool résultant de la protéine a été préparé par le Pr. Geoffrey Chang, congelé dans l'azote liquide puis transporté dans de la carboglace jusqu'au laboratoire. L'échantillon décongelé a ensuite été injecté sur colonne Superdex 200 comme pour BmrA. Le tampon de migration contient 20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 0,01% cholate et 0,035% DDM. La courbe étalon pour le DDM a été réalisée en présence de 0,01% de cholate et a été utilisée, après ajout de 0,05% de DDM<sup>D</sup>, pour doser le DDM contenu dans les fractions éluées de mP-gp. La concentration de cholate a été estimée comme décrit précédemment.

⊕ **hAAC1** (un échangeur ADP/ATP humain) : La protéine est produite dans *Escherichia coli* fusionnée avec la Maltose-binding Protein et munie d'une agrafe octahistidine à son extrémité N-terminale. L'échantillon utilisé a été fourni par le Dr. Stéphanie Ravaut (IBS). La protéine est extraite en présence de FC12, purifiée par chromatographie d'affinité métal puis clivée par la thrombine pour éliminer la maltose-binding protein. La protéine est ensuite déposée sur colonne de gel filtration de type Superdex 200 10-300 dans du tampon 50 mM tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1% FC12. Les fractions contenant hAAC1 sont poolées et le pool est concentrées 20 fois sur Amicon Ultra Ultracel 10k. Le même volume de tampon est concentré dans des conditions identiques. La tête du pic d'élution de gel filtration, le pool de gel filtration avant et après concentration sont dosés en ajoutant 0,1% de FC12<sup>D</sup> comme standard interne.

**BmrC/D** (un transporteur ABC procaryote de *Bacillus subtilis*) : BmrCD est produite et purifiée en présence de DDM par chromatographie d'affinité métal et gel filtration comme décrit dans Galian et *al.* 2011. L'échantillon utilisé a été fourni par le docteur Jean-Michel Jault (IBS-IBCP). Le DDM contenu dans les fractions les plus concentrées de la chromatographie Nickel (fraction 7) et gel filtration (fraction 94) a été dosé en ajoutant 0,1% de DDM<sup>D</sup> comme standard interne.

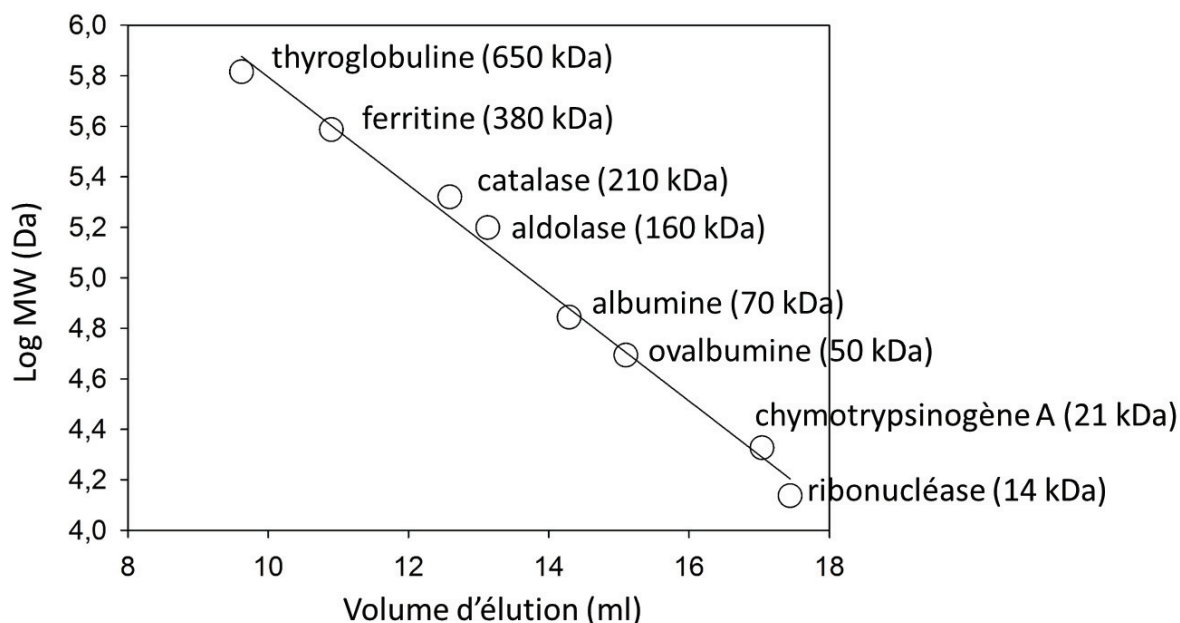
⊕ **hP2Y1r** (un récepteur purinergique humain) : hP2Y1r est produite dans la levure *Pichia pastoris* à l'aide du vecteur d'expression décrit dans André et *al.*, 2006. L'échantillon utilisé a été fourni par le docteur Renaud Wagner (Université de Strasbourg). La protéine est extraite en présence de DDM puis purifiée par chromatographie d'affinité métal suivi d'un

dessalage dans un tampon 50 mM tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, 0,1% DDM et 0,01% cholestéryl hemisuccinate. La protéine est extraite en présence de DDM puis purifiée par chromatographie d'affinité métal suivi d'un dessalage dans un tampon 0,05 M tris-HCl pH 7,4, 0,5 M NaCl, 1 g/L DDM et 0,1 g/L cholestérol hemisuccinate. Le pool est concentré 20 fois sur vivaspin 500 de seuil 50 000 daltons Amicon Ultra Ultracel 10k. Le même volume de tampon est concentré dans des conditions identiques. Le DDM est dosé en ajoutant 0,1% de DDM<sup>D</sup>.

⊕ **SERCA1a** : Expérience réalisée par le Dr. Cédric Montigny et le Pr. Marc le Maire (Saclay). Des membranes enrichies en SERCA1a ont été préparées comme décrit dans Champeil et *al.*, 1986. Les membranes sont solubilisées avec du DDM puis les protéines extraites sont injectées sur colonne de gel filtration avec du DDM ou du <sup>14</sup>C-DDM pour doser par radioactivité la quantité de DDM présente. 2 mg de SERCA1a solubilisé dans du DDM et 4 mg de SERCA1a dans 40 mg de <sup>14</sup>C-DDM sont chargés sur une colonne TSK3000SW, préalablement équilibrée avec du tampon 20 mM MOPS-Tris pH 7,0, 25 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> et 0,05% DDM. Pour chaque expérience, les fractions du pic d'élution ont été rassemblées puis concentrées. Les échantillons ont ensuite été ré-injectés sur colonne de gel filtration afin de doser le DDM par radioactivité (le Maire et *al.*, 2008) et par MALDI-MS.

### Calibration de la colonne Superdex 200

La colonne de gel filtration a été étalonnée afin de déterminer avec précision la taille des complexes protéine-détergent. Les protéines suivantes (High et low Molecular Weight Gel Filtration Kit) ont été préparées et la colonne équilibrée avec deux volumes de tampon 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,3% (w/v) FC12 : thyroglobuline (650 kDa), ferritine (380 kDa), catalase (210 kDa), aldolase (160 kDa), albumine (70 kDa), ovalbumine (50 kDa), chymotrypsinogène A (21 kDa), et ribonucléase (14 kDa). Le volume mort  $V_0$  de la colonne est déterminé en injectant du bleu dextran 2000 préparé à 1 mg/ml dans le tampon 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,3% (w/v) FC12. A partir du volume mort  $V_0$ , du volume total de la colonne  $V_t$ , et du volume d'élution  $V_e$  de chacune des protéines utilisées, une droite est obtenue  $V_e/V_0$  vs log MW.

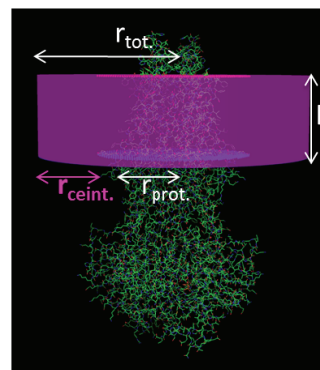
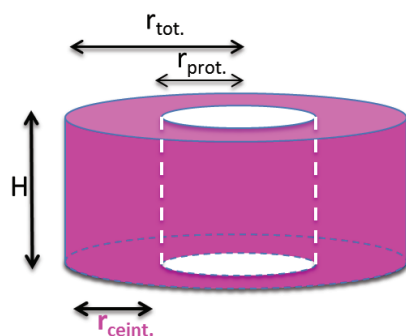


**Figure 99 : Calibration de la colonne Superdex 200.**

La colonne de gel filtration est étalonnée avec des marqueurs de masse moléculaire (cercles et axe logarithmique de gauche) : thyroglobuline (650 kDa), ferritine (380 kDa), catalase (210 kDa), aldolase (160 kDa), albumine (70 kDa), ovalbumine (50 kDa), chymotrypsinogène A (21 kDa), et ribonucléase (14 kDa).

### Estimation de la taille de la ceinture de détergent associée à BmrA

Nous sommes parvenus à estimer la taille de la ceinture de DDM, FC12, LMNG et DDM-cholate associée à BmrA en assimilant ce complexe à une couronne cylindrique. La formule qui permet de calculer le volume d'une couronne circulaire est illustrée dans la figure 100. Afin de déterminer l'épaisseur  $H$  de la ceinture de détergent, nous avons utilisé le serveur OPM (Orientations of Proteins in Membranes) mis en ligne par l'université du Michigan (<http://opm.phar.umich.edu/server.php>) qui permet d'estimer la position d'une protéine membranaire par rapport à la membrane (Lomize, Pogozheva et *al.*, 2012). Cette méthode a été validée avec plusieurs protéines transmembranaires telles que la rhodopsine (Hubbell, Altenbach et *al.*, 2003) avec des écarts de positionnement inférieurs à 1 Å. Dans le cas de BmrA, le serveur OPM prédit une épaisseur de 31 Å. Nous savons que 400 molécules de DDM sont associées à la protéine, ce qui correspond à un volume total de détergent d'environ  $400 \times 453 = 181\,000 \text{ Å}^3$ . A partir de l'équation 1, nous pouvons donc en déduire le rayon de la couronne de DDM  $\approx 27.4 \text{ Å}$ .



$$\text{(eq. 1) } V_{\text{ceint}} = \pi \times (r_{\text{tot.}}^2 - r_{\text{prot.}}^2) \times H$$

$$r_{\text{tot.}} = \sqrt{(V_{\text{ceint}} / (\pi \times H)) + r_{\text{prot.}}^2}$$

$$r_{\text{ceint.}} = r_{\text{tot.}} - r_{\text{prot.}}$$

Dans le cas de BmrA-DDM:

$$r_{\text{prot.}} \approx 20 \text{ \AA}$$

$$H = 31 \text{ \AA}$$

$$V_{\text{DDM}} (\text{monomère}) = 453 \text{ \AA}^3$$

400 molécules de DDM sont liées à BmrA donc:

$$V_{\text{ceint-BmrA}} = 400 \times 453 = 180\,747 \text{ \AA}^3$$

$$r_{\text{tot.}} = 47.6 \text{ \AA} / r_{\text{ceint.}} = 27.4 \text{ \AA}$$

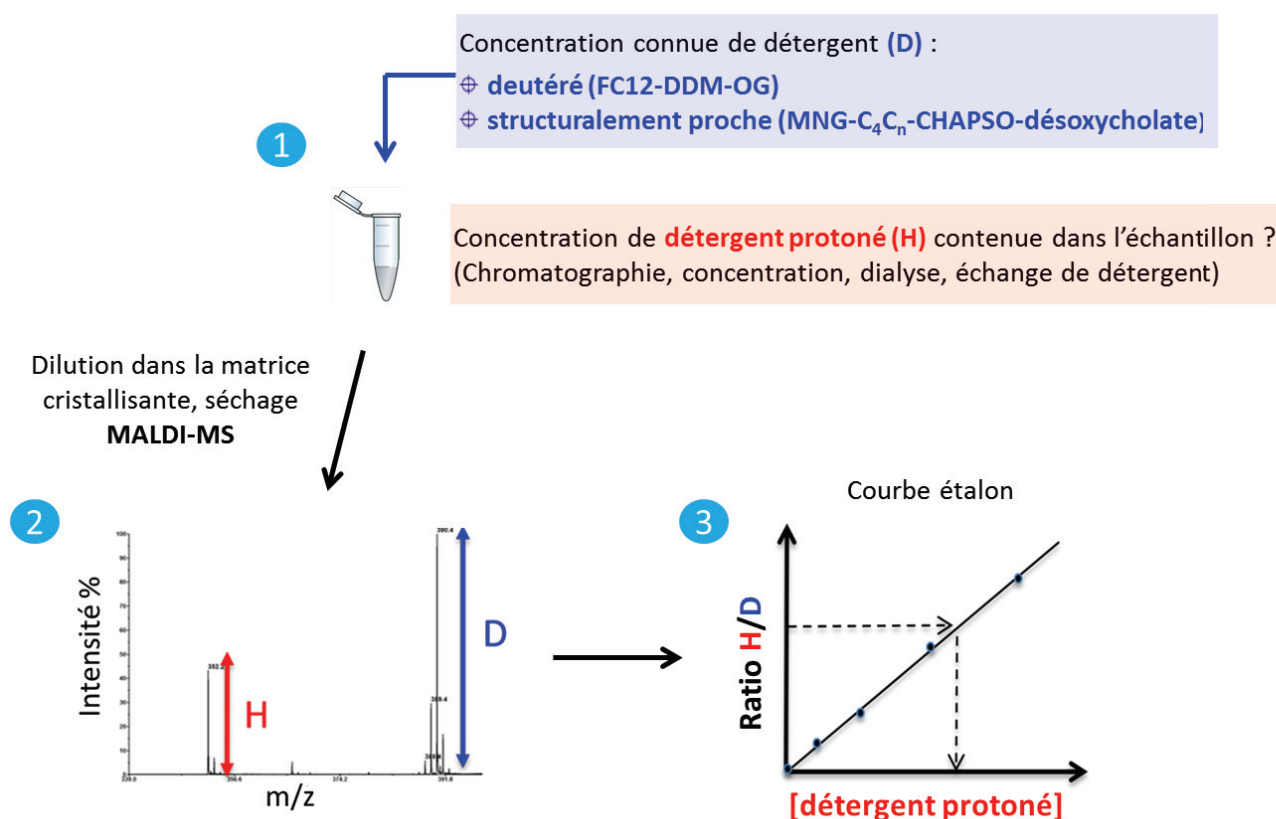
### Figure 100 : Estimation de la taille de la ceinture de détergent associée à BmrA

La ceinture de détergent associée à BmrA est assimilée à une couronne circulaire. La formule qui permet de déterminer le volume d'une couronne cylindrique est indiquée (eq. 1). Un exemple de calcul est donné sur la droite avec BmrA purifié en DDM. L'épaisseur H de la membrane est déterminée avec le logiciel OPM. Le rayon de la ceinture de détergent peut alors être déduit de l'équation 1.

## B. RESULTATS

### Principe de la méthode de dosage des détergents par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof

Notre approche est centrée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-Tof pour quantifier les détergents, un concept inspiré du dosage de protéines et de peptides (ammon et *al.*, 2005) ou des sels d'aryl phosphonium (Gebler et *al.*, 2003). Le principe de la méthode est illustré dans la figure 101. A partir d'une solution donnée contenant un détergent ou un mélange de détergents protonés, on ajoute une quantité connue du même détergent deutéré (par exemple, la FC12 protoné vs la FC12 deutéré) ou bien, à défaut, d'un détergent structuralement peu différent pour avoir une masse moléculaire distincte (par exemple, le LMNG vs le DMNG) mais avec des propriétés physicochimiques proches (figure 101-1).



**Figure 101 : Le principe de la méthode de dosage des détergents par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof.**

Mélangés à une matrice adaptée, l'ensemble est bombardé par laser dans un spectromètre de masse qui détecte les proportions relatives de chaque espèce de détergent (figure 101-2). En utilisant différents ratio d'isotopes (H/D) ou de deux détergents de structures proches et en maintenant le standard constant, on obtient une courbe étalon du type de celle schématisée dans la figure 101-3, qui permet de déduire la quantité de détergent dans la solution à analyser.

### Quantification des détergents seuls

La méthode a été validée avec les quatre principaux types de détergents : les dérivés sucrés comme le n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside ( $\beta$ -DDM), le n-octyl- $\beta$ -D-glucoside ( $\beta$ -OG) et le lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) (Chae et al., 2010), les détergents zwitterioniques comme la foscholine 12 (FC12) et le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), les détergents anioniques tels que le decyl tris[carboxyméthyl]-monoalkoxy-trihydroxycalix[4]arene ( $C_4C_{12}$ ) et les composés de type biliaire comme le sodium cholate. Les standards utilisés sont des dérivés deutérés, lorsqu'ils sont disponibles commercialement, ce qui est le cas du DDM, de l'OG et de la FC12 ou bien des molécules structuralement proches comme le decyl maltoside (DMNG) pour le LMNG, le  $C_4C_{10}$  pour le  $C_4C_{12}$ , le 2-hydroxy chaps (CHAPSO) pour le CHAPS et le désoxycholate pour le cholate.



Les matrices, utilisées pour la cristallisation des échantillons, ont été choisies selon deux critères : leur capacité à former un dépôt qui est homogène et le fait d'obtenir une bonne désorption/ionisation. Le 2,5-Dihydroxybenzoate (DHB) et l'acide  $\alpha$ -cyano hydroxycanimmique (CHCA) ont typiquement été utilisés pour analyser les détergents portant des groupements ammoniums, polaires ou sucrés. Dans le cas du LMNG, nous avons utilisé le 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (THAP) qui permet de transférer une énergie d'activation plus faible lors du processus d'ionisation et conduit ainsi à des signaux plus stables. Enfin, nous avons utilisé le 9-Aminoacridine pour désorber le cholate et le désoxycholate.

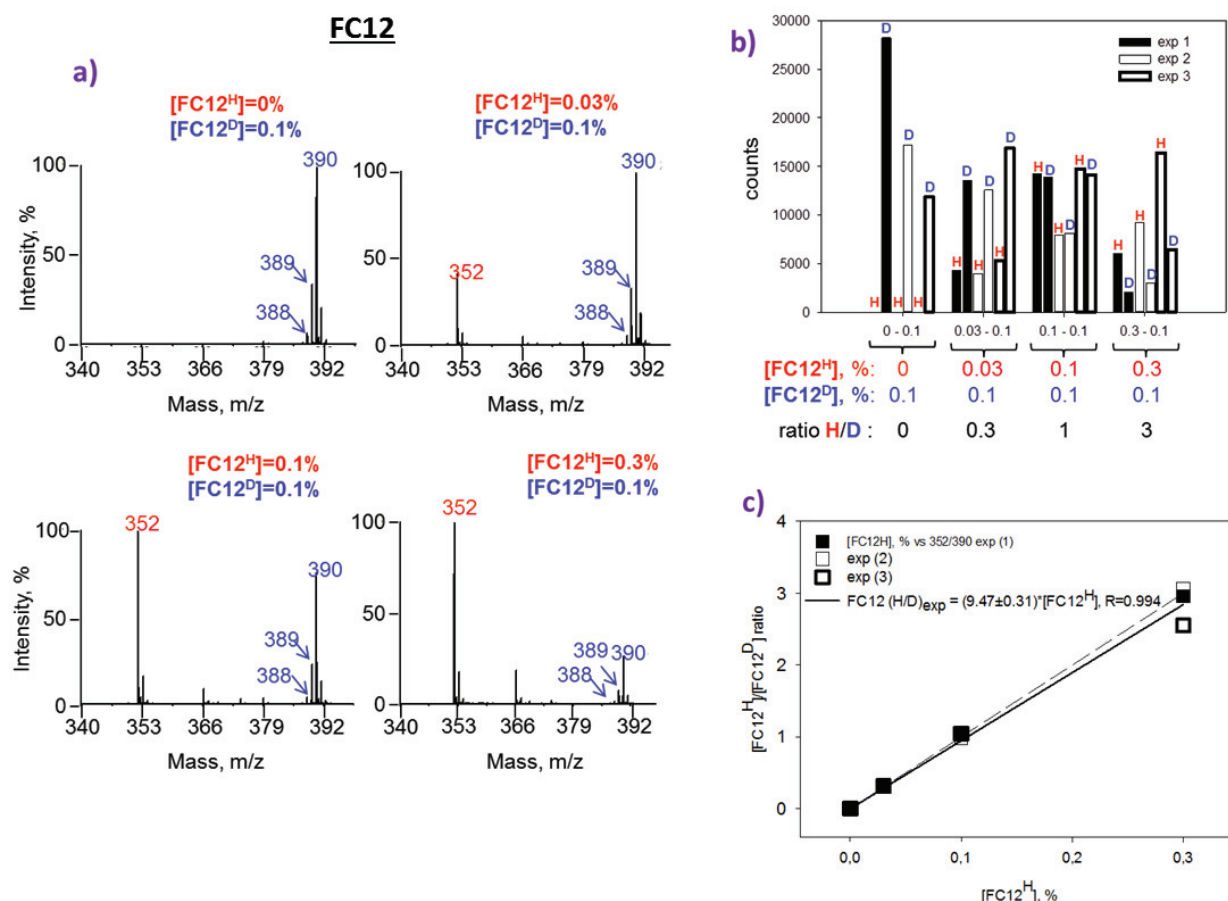
Pour chaque couple de détergent, des solutions contenant 0,1% (w/v) de standard et 0, 0,03, 0,1, 0,3% de détergent protoné ont été préparées pour obtenir des ratios 1/3, 1/1 et 3/1. Les échantillons, dilués dans une matrice cristallissante, ont ensuite été bombardés par un laser dans un spectromètre de masse.

#### a) Dosage de la foscholine 12

Comme illustré dans la figure 102a ci-dessous, on observe que l'ajout de quantités croissantes de FC12<sup>H</sup> dans la FC12<sup>D</sup> modifie en proportion le rapport des pics respectifs à 352 pour la FC12<sup>H</sup> et 388, 389, 390 pour la FC12<sup>D</sup>.

La figure 102b montre que les intensités des coups de chaque série de tirs s'étendent de 5 000 à 30 000. Elles varient du simple au triple, sans corrélation, dépendant de l'efficacité de désorption des solutés par le laser à un point donné de la matrice. En revanche, le rapport protoné/deutéree de chaque essai est lui constant comme le montre le faible écart entre les valeurs de chaque triplicat à une concentration donnée de FC12<sup>H</sup>.

La représentation des ratios MALDI FC12<sup>H</sup>/FC12<sup>D</sup> en fonction de la concentration en FC12<sup>H</sup>, indiquée dans la figure 102c, montre que la réponse est bien linéaire et reliée à la quantité de FC12<sup>H</sup> déposée, par rapport à celle de FC12<sup>D</sup> présente. La valeur de la pente obtenue expérimentalement est de  $9,47 \pm 0,31$ , avec un  $R^2$  de 0,994, soit très proche de la valeur théorique, 10. La répétition de cette expérience une dizaine de fois montre une erreur inférieure à 10%.



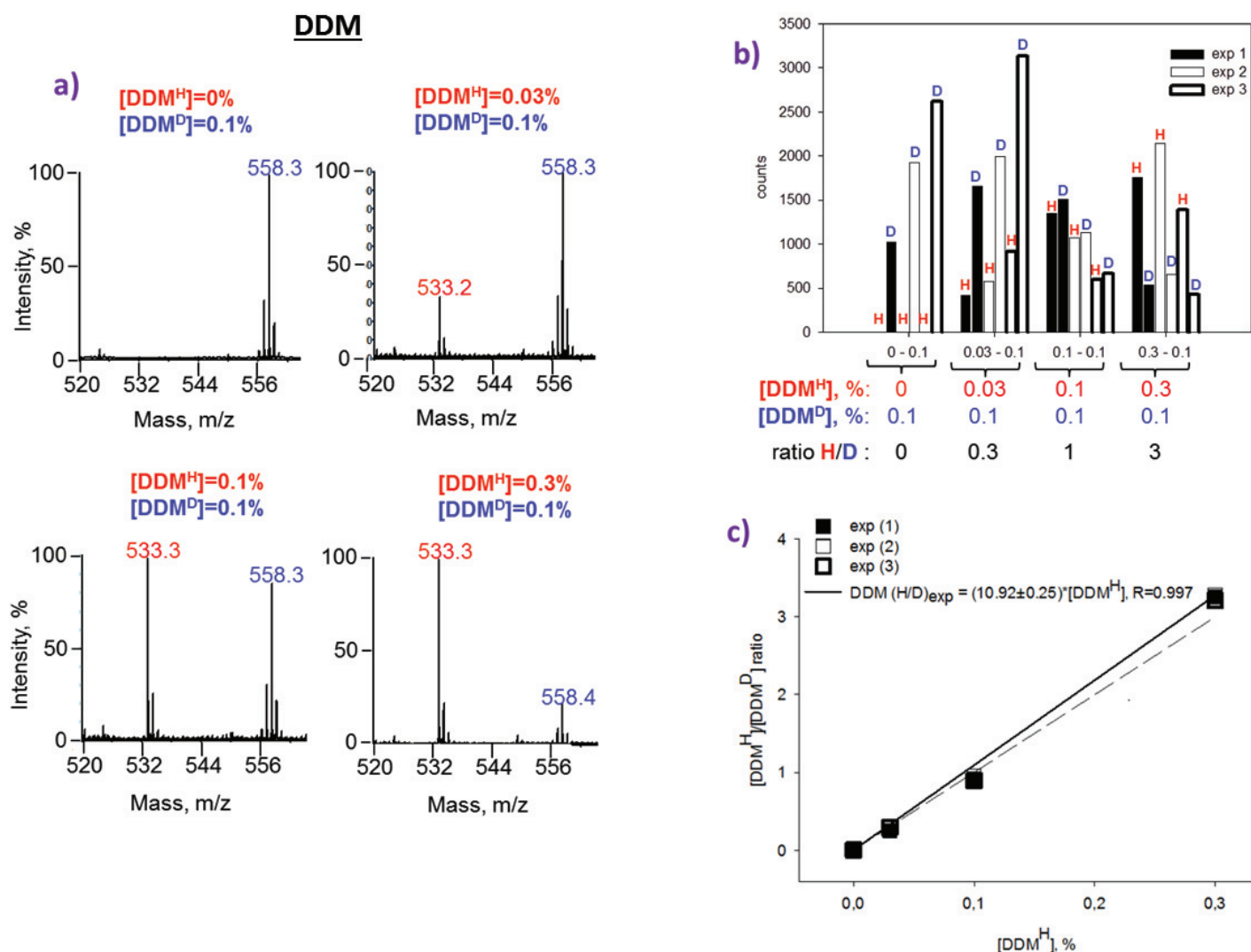
**Figure 102 : Dosage par MALDI MS de la foscholine 12 protonée (FC12<sup>H</sup>) par la foscholine 12 deutéré (FC12<sup>D</sup>).**

A) Spectres de masse obtenus avec 0,1% de FC12<sup>D</sup> et 0, 0,03, 0,1 ou 0,3% de FC12<sup>H</sup>. Les pics de masse respectifs sont quantifiés à 352 pour la FC12<sup>H</sup> et 388, 389 et 390 pour la FC12<sup>D</sup>. Le pic le plus abondant correspond à 100% dans chaque spectre, indépendamment de sa quantité absolue et de sa nature. B) Coups enregistrés pour chaque essai avec trois expériences réalisées indépendamment. C) Représentation du ratio MALDI H/D en fonction de la concentration en FC12<sup>H</sup>. Les courbes (triplicats) sont ajustées par une équation du type  $y=ax+b$ , où  $a$  correspond à la pente de la droite et  $b$ , l'ordonnée à l'origine, ici 0. La courbe en pointillé noir correspond à la courbe théorique et celle en trait plein noir correspond à la courbe expérimentale.

## b) Dosage du $\beta$ -DDM

Comme illustré dans la figure 103, on observe le même type de résultats avec ce détergent qu'avec la FC12. L'addition de quantités croissantes de DDM<sup>H</sup> dans le DDM<sup>D</sup> modifie en proportion le rapport des pics respectifs à 533 pour le DDM<sup>H</sup> et 556, 557, 558 pour le DDM<sup>D</sup>. La figure 103b montre que les intensités des coups sur chaque série de tirs s'étendent cette fois de 500 à 3000, soit dix fois plus faible qu'avec la FC12. Mais le rapport

H/D de chaque essai reste malgré tout constant comme pour la FC12. La représentation du ratio MALDI  $\text{DDM}^{\text{H}}/\text{DDM}^{\text{D}}$  montre que la réponse est bien linéaire et reliée à la quantité de  $\text{DDM}^{\text{H}}$  déposée, par rapport à celle de  $\text{DDM}^{\text{D}}$  présente. La valeur de la pente obtenue expérimentalement est de  $10,32 \pm 0,25$ , avec un  $R^2$  de 0,997, soit dans ce cas aussi très proche de la valeur théorique, 10.

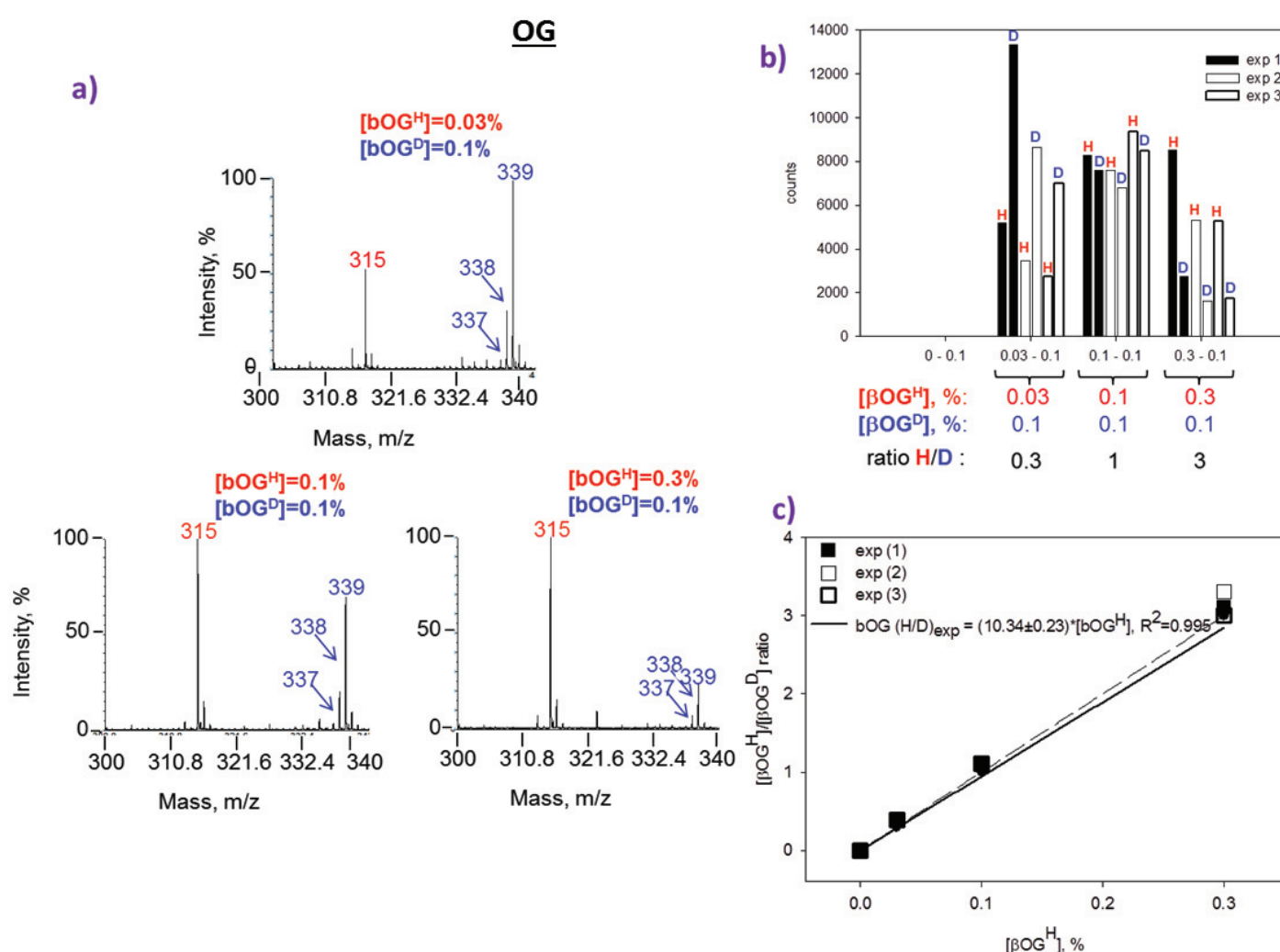


**Figure 103 : Dosage par MALDI MS du  $\text{DDM}^{\text{H}}$  par le  $\text{DDM}^{\text{D}}$ .**

A) Spectres de masse obtenus avec 0,1% de  $\text{DDM}^{\text{D}}$  et 0, 0,03, 0,1 ou 0,3% de  $\text{DDM}^{\text{H}}$ . Les pics de masse respectifs sont quantifiés à 533 pour le  $\text{DDM}^{\text{H}}$  et 556, 557 et 558 pour le  $\text{DDM}^{\text{D}}$ . Le pic le plus abondant correspond à 100% dans chaque spectre, indépendamment de sa quantité absolue et de sa nature. B) Coups enregistrés pour chaque essai avec trois expériences indépendantes. C) Représentation des ratios MALDI  $\text{DDM}^{\text{H}}/\text{DDM}^{\text{D}}$  en fonction de la concentration de  $\text{DDM}^{\text{H}}$ . Les courbes (triplicats) sont ajustées par une équation du type  $y=ax+b$ , où  $a$  correspond à la pente de la droite et  $b$ , l'ordonnée à l'origine, ici 0. La courbe en pointillé noir correspond à la courbe théorique et celle en trait plein noir à la courbe expérimentale.

### c) Dosage du $\beta$ -OG

Comme illustré dans la figure 104, on observe les mêmes résultats avec ce détergent qu'avec la FC12 ou le DDM. L'addition de quantités croissantes de  $\beta$ -OG<sup>H</sup> dans le  $\beta$ -OG<sup>D</sup> modifie en proportion le rapport des pics respectifs à 315 pour le  $\beta$ -OG<sup>H</sup> et 337, 338, 339 pour le  $\beta$ -OG<sup>D</sup>. La figure 104b montre que les intensités des coups sur chaque série de tirs s'étendent de 2000 à 12000, intermédiaire donc entre FC12 et DDM. Le rapport H/D de chaque essai est lui bien constant. La représentation des ratios MALDI  $\beta$ -OG<sup>H</sup>/ $\beta$ -OG<sup>D</sup> en fonction de la concentration en  $\beta$ -OG<sup>H</sup> montre que la réponse est linéaire et reliée à la quantité de  $\beta$ -OG<sup>H</sup> déposée, par rapport à celle de  $\beta$ -OG<sup>D</sup> présente. La valeur de la pente obtenue expérimentalement est de  $10,34 \pm 0,23$ , avec un  $R^2$  de 0,995, soit dans ce cas encore très proche de la valeur théorique de 10.



**Figure 104 : Dosage par MALDI MS du  $\beta$ -OG<sup>H</sup> par le  $\beta$ -OG<sup>D</sup>.**

A) Spectres de masse obtenus avec 0,1% de  $\beta$ -OG<sup>D</sup> et 0,03, 0,1 ou 0,3% de  $\beta$ -OG<sup>H</sup>. Les pics de masse respectifs sont quantifiés à 315 pour le  $\beta$ -OG<sup>H</sup> et 337, 338 et 339 pour le  $\beta$ -OG<sup>D</sup>. Le pic le plus abondant correspond à 100% dans chaque spectre, indépendamment de sa quantité absolue et de sa nature. B) Coups enregistrés pour chaque essai avec trois expériences indépendantes. C) Représentation

des ratios MALDI  $\beta\text{-OG}^{\text{H}}/\beta\text{-OG}^{\text{D}}$  en fonction de la concentration de  $\beta\text{-OG}^{\text{H}}$ . Les courbes (triplicats) sont ajustées par une équation du type  $y=ax+b$ , où  $a$  correspond à la pente de la droite et  $b$ , l'ordonnée à l'origine, ici 0. La courbe en pointillés noirs correspond à la courbe théorique et celle en trait plein à la courbe expérimentale.

#### d) Dosage du $\text{C}_4\text{C}_{12}$

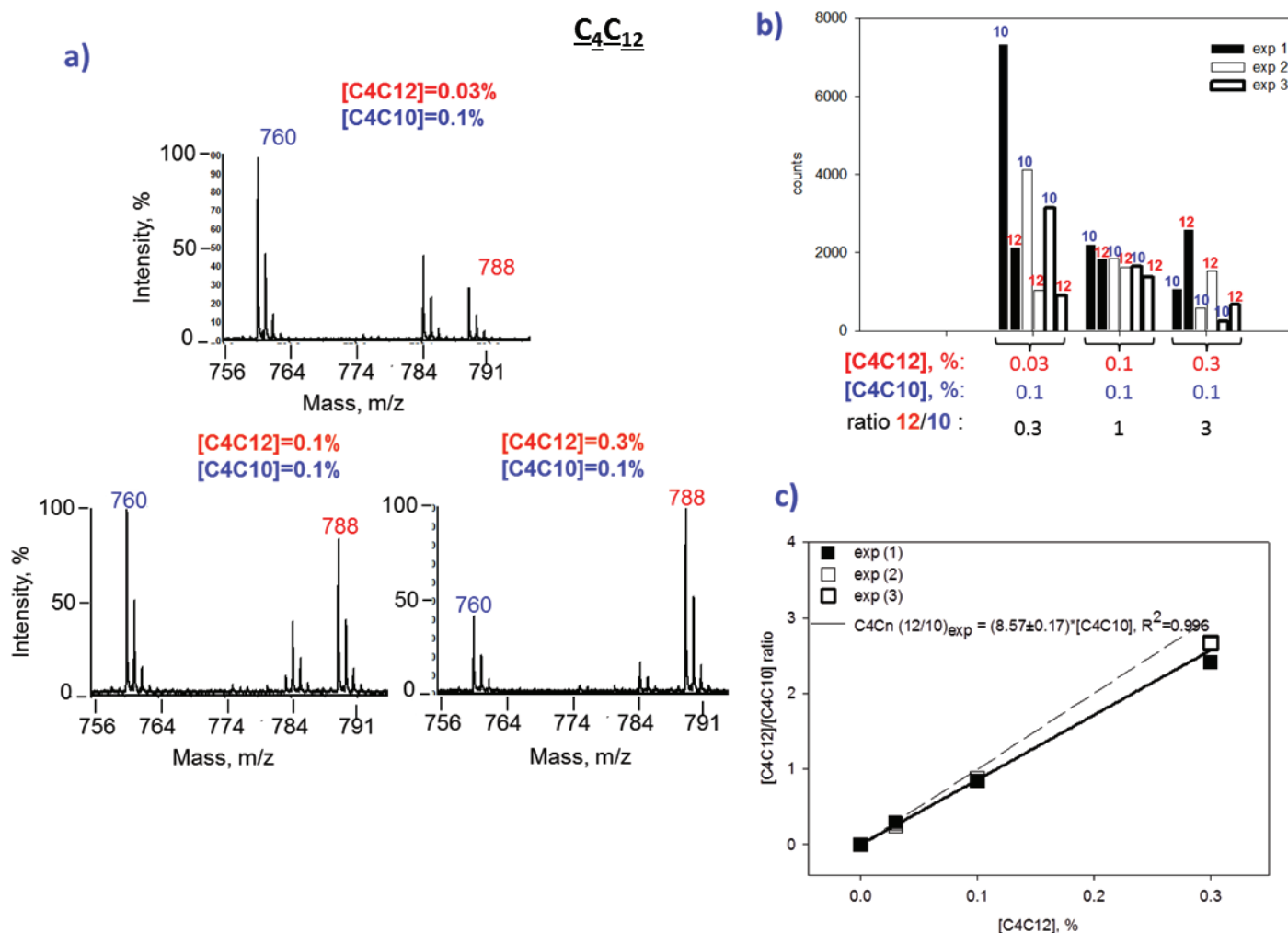
A la différence des trois exemples précédents dans lesquels les versions deutérées d'un détergent sont utilisées pour doser l'équivalent protoné, les exemples qui vont suivre utilisent deux composés protonés distincts mais de structure voisine pour quantifier l'un avec l'autre.

Comme illustré dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** 105, on observe les mêmes résultats qu'avec les dérivés deutérés utilisés dans les exemples précédents. L'addition de quantités croissantes de  $\text{C}_4\text{C}_{12}$  modifie en proportion le rapport des pics respectifs à 788 pour le  $\text{C}_4\text{C}_{12}$  et 761 pour le  $\text{C}_4\text{C}_{10}$ .

La figure 105b montre que les intensités des coups sur chaque série de tirs s'étendent de 2 000 à 8 000, avec une perte relative de réponse des solutions les plus concentrées par rapport aux plus diluées. Ceci suggère que diluer l'échantillon permet d'améliorer la désorption des molécules. Quoiqu'il en soit, le rapport  $\text{C}_4\text{C}_{12}/\text{C}_4\text{C}_{10}$  de chaque essai est constant d'un essai à l'autre ce qui confirme la bonne qualité de la réponse.

La représentation des ratios MALDI  $\text{C}_4\text{C}_{12}/\text{C}_4\text{C}_{10}$  en fonction de la concentration en  $\text{C}_4\text{C}_{12}$  dans la figure 105c montre que la réponse est linéaire et proportionnelle à la quantité de  $\text{C}_4\text{C}_{12}$  déposée, par rapport à celle de  $\text{C}_4\text{C}_{10}$  présente. La valeur de la pente obtenue expérimentalement est de  $8,57 \pm 0,17$ , avec un  $R^2$  de 0,996, soit dans ce cas moins proche de la valeur théorique de 10, mais néanmoins proportionnelle.





**Figure 105 : Dosage par MALDI MS du  $C_4C_{12}$  par le  $C_4C_{10}$ .**

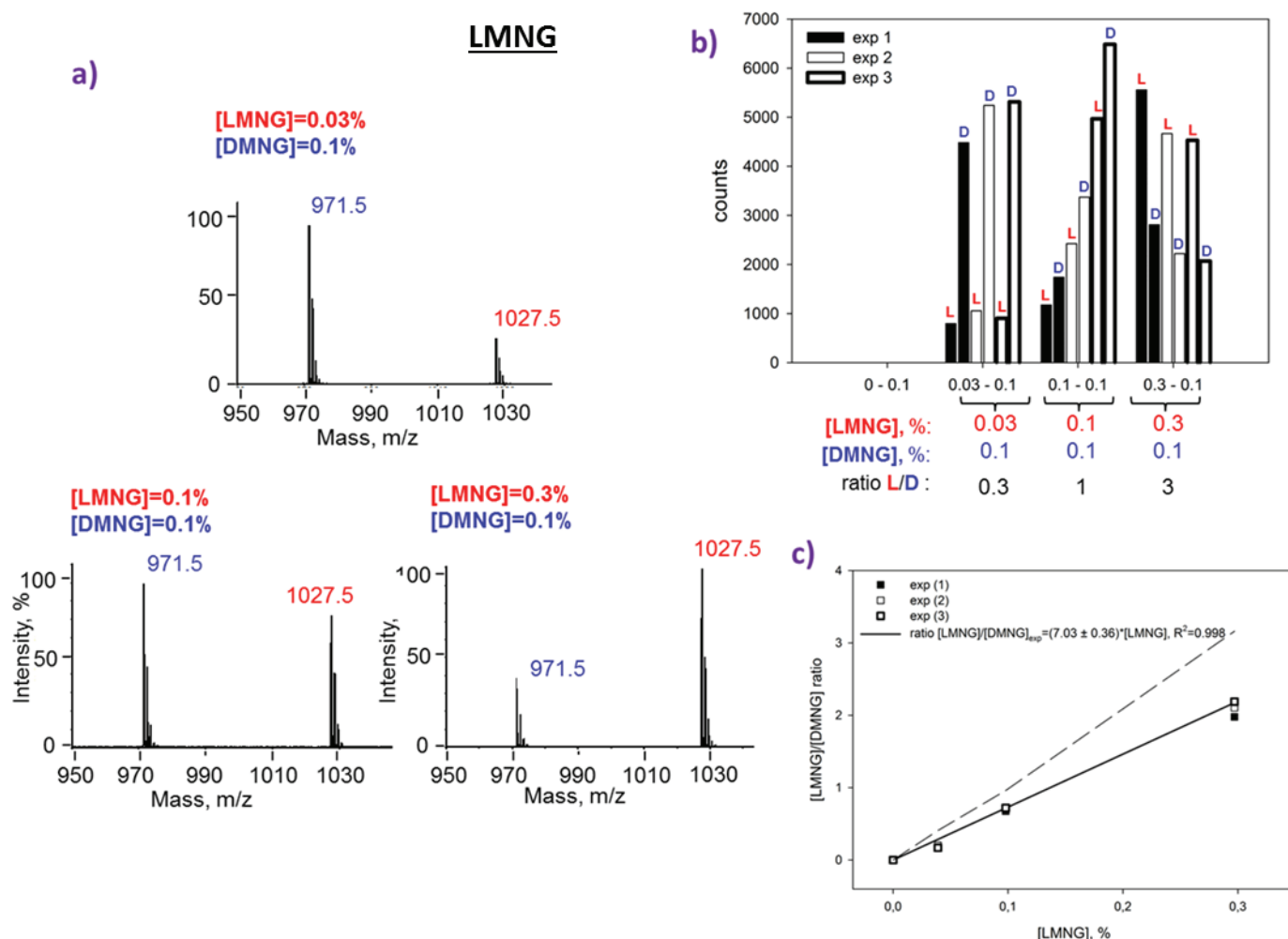
A) Spectres de masse obtenus avec 0,1% de  $C_4C_{10}$  et 0,03, 0,1 ou 0,3% de  $C_4C_{12}$ . Les pics de masse respectifs sont quantifiés à 788 pour le  $C_4C_{12}$  et 760 pour le  $C_4C_{10}$ . Le pic le plus abondant correspond à 100% dans chaque spectre, indépendamment de sa quantité absolue et de sa nature. B) Coups enregistrés pour chaque essai avec trois expériences indépendantes. C) Représentation des ratios MALDI  $C_4C_{12}/C_4C_{10}$  en fonction de la concentration de  $C_4C_{12}$ . Les courbes (triplicats) sont ajustées par une équation du type  $y=ax+b$ , où  $a$  correspond à la pente de la droite et  $b$ , l'ordonnée à l'origine, ici 0. La courbe en pointillés noirs correspond à la courbe théorique et celle en trait plein à la courbe expérimentale.

### e) Dosage du LMNG

Comme illustré dans la figure 106a ci-dessous, on observe que l'ajout de quantités croissantes de LMNG dans le DMNG modifie en proportion le rapport des pics respectifs à 1027,5 pour le LMNG et 971,5 pour le DMNG.

La figure 106b montre que les intensités des coups de chaque série de tirs s'étendent de 1 000 à 6 000. Le rapport H/D de chaque essai est lui constant comme le montre le faible écart entre les valeurs de chaque triplicat à une concentration donnée de LMNG.

La représentation du ratio MALDI LMNG/DMNG en fonction de la concentration en LMNG, indiquée dans la figure 106c, montre que la réponse obtenue est bien linéaire et reliée à la quantité de LMNG déposée, par rapport à celle de DMNG présente. La valeur de la pente obtenue expérimentalement est de  $7,03 \pm 0,36$ , avec un  $R^2$  de 0,998, ce qui est assez éloigné de la valeur théorique, 10. Mais comme on peut le voir la relation entre les ratios MALDI et la concentration en LMNG reste bien proportionnelle.



**Figure 106 : Dosage par MALDI MS du LMNG par le DMNG.**

A) Spectres de masse obtenus avec 0,1% de DMNG et 0,03, 0,1 ou 0,3% de LMNG. Les pics de masse respectifs sont quantifiés à 1027,5 pour le LMNG et 971,5 pour le DMNG. Le pic le plus abondant correspond à 100% dans chaque spectre, indépendamment de sa quantité absolue et de sa nature. B) Coups enregistrés pour chaque essai avec trois expériences indépendantes. C) Représentation des ratios MALDI LMNG/DMNG en fonction de la concentration de LMNG. Les courbes (triplicats) sont ajustées par une équation

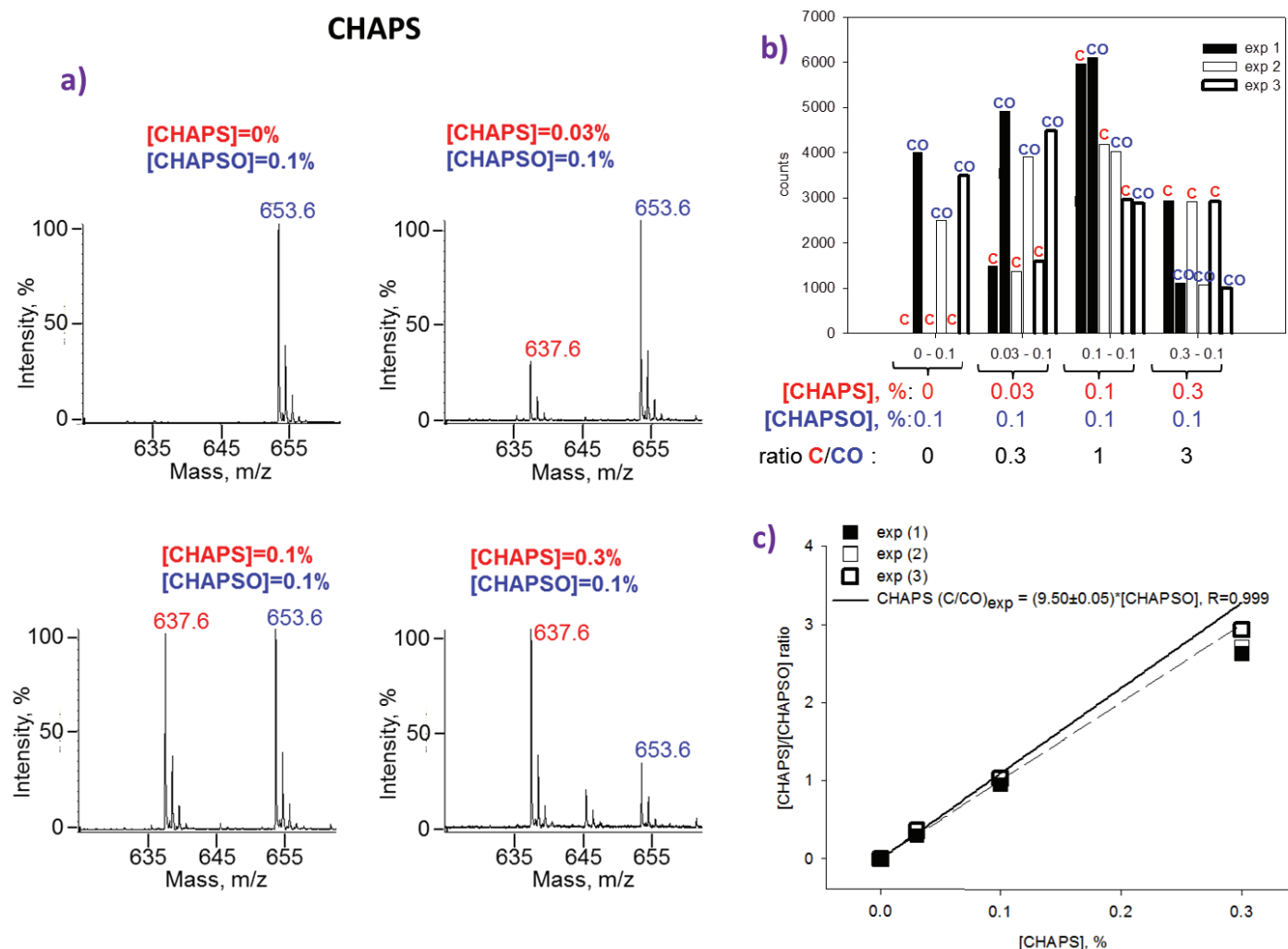
tion du type  $y=ax+b$ , où  $a$  correspond à la pente de la droite et  $b$ , l'ordonnée à l'origine, ici 0. La courbe en pointillés noirs correspond à la courbe théorique et celle en trait plein à la courbe expérimentale.

#### f) Dosage du CHAPS

On observe dans la figure 107a ci-dessous que l'ajout de quantités croissantes de CHAPS dans le CHAPSO modifie en proportion le rapport des pics respectifs à 637,6 pour le CHAPS et 653,6 pour le CHAPSO.

La figure 107b indique que les intensités des coups de chaque série de tirs s'étendent, comme pour le LMNG, de 1 000 à 6 000 avec le rapport CHAPS/CHAPSO de chaque essai qui reste constant.

La représentation du ratio MALDI CHAPS/CHAPSO en fonction de la concentration en CHAPS, indiquée dans la figure 107c, montre que la courbe obtenue est linéaire et reliée à la quantité de CHAPS déposée, par rapport à celle de CHAPSO présente. La valeur de la pente obtenue expérimentalement est de  $9,50 \pm 0,05$ , avec une linéarité parfaite ( $R^2$  de 0,999), ce qui est très proche de la valeur théorique, 10.



**Figure 107 : Dosage par MALDI MS du CHAPS par le CHAPSO.**

A) Spectres de masse obtenus avec 0,1% de CHAPSO et 0, 0,03, 0,1 ou 0,3% de CHAPS. Les pics de masse respectifs sont quantifiés à 637,6 pour le CHAPS et 653,6 pour le CHAPSO. Le pic le plus abondant correspond à 100% dans chaque spectre, indépendamment de sa quantité absolue et de sa nature. B) Coups enregistrés pour chaque essai avec trois expériences indépendantes. C) Représentation des ratios MALDI CHAPS/ CHAPSO en fonction de la concentration de CHAPSO. Les courbes (triplicats) sont ajustées par une équation du type  $y=ax+b$ , où  $a$  correspond à la pente de la droite et  $b$ , l'ordonnée à l'origine, ici 0. La courbe en pointillés noirs correspond à la courbe théorique et celle en trait plein à la courbe expérimentale.

L'ensemble de ces résultats montre que l'efficacité de désorption d'un détergent, à une concentration donnée varie d'une expérience à l'autre. En revanche, le rapport H/D de chaque essai reste lui constant, ce qui nous a permis d'obtenir des droites étalons parfaitement linéaires ( $r^2 > 0,99$ ) avec des pentes expérimentales proches de leur valeur théorique,

10, excepté pour le LMNG pour lequel nous avons obtenu de façon reproductible une pente de 7,03. Notre méthode permet donc de doser n'importe quel type de détergent, à condition qu'il existe pour ce dernier une version deutérée ou un autre étalon structuralement proche.

### Limite de détection et application à l'étape de dialyse

Réalisé avec le Dr. Vincent Chaptal. Nous avons déterminé la limite de détection de la méthode en mesurant les ratios protoné-deutéié de solutions de DDM et FC12, après dilutions successives jusqu'à ce que le rapport signal sur bruit empêche la mesure précise des détergents (figure 108a). A partir d'une solution de DDM à 0,2% (39,2 mM), nous avons pu doser précisément la concentration en détergent jusqu'à une dilution 1000X et le détecter en le diluant encore dix fois plus. Pour la FC12, nous avons utilisé une concentration initiale plus faible par rapport au DDM (0,02%, 5,6 mM) pour éviter de saturer le détecteur. Nous sommes parvenus à mesurer le détergent jusqu'à une dilution 100X. La différence de limite de détection entre les détergents s'explique par la différence de désorption des ions par le laser. Au final, la FC12 et le DDM peuvent être mesurées jusqu'à des valeurs respectivement 100 et 1000 fois inférieures à leur concentration micellaire critique (CMC).

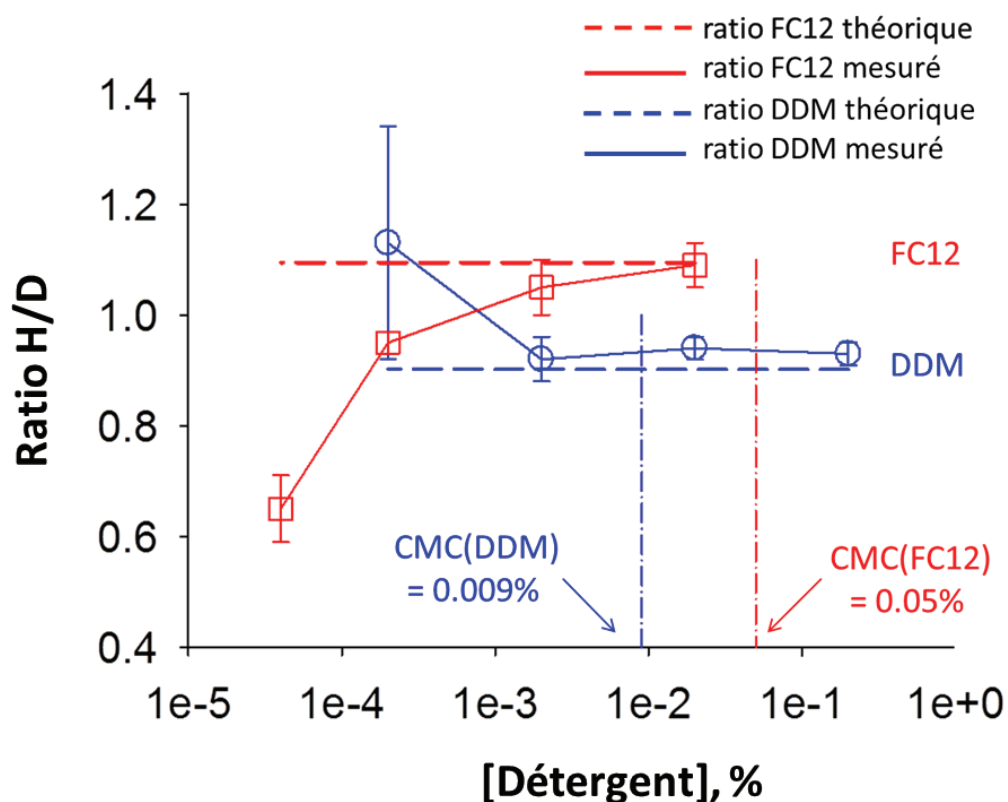
Réalisé avec le Dr. Rima Matar. Comme preuve de concept, nous avons tenté de mesurer la quantité résiduelle de FC12 et DDM après une expérience de dialyse réalisée sur la protéine membranaire BmrA, une quantification qui jusque là avait pu être réalisée seulement avec des détergents radiomarqués (Lenoir et *al.*, 2002; Dahout-Gonzalez et *al.*, 2003). Nous avons extrait et purifié BmrA en FC12 ou DDM (cf matériel et méthodes). Après purification, la protéine a été mélangée avec des lipides et l'échantillon a été mis à dialyser dans un boudin possédant un seuil de perméabilité de 10 000 Daltons pendant 2 x 24H afin de reconstituer BmrA dans un environnement membranaire.

Comme illustré dans la figure 108b ci-dessous, le dosage de la FC12 et du DDM après 48 H par MALDI-Tof indique des concentrations résiduelles respectivement de 0,01% et 0,009%. Ceci démontre que le processus de dialyse est efficace pour éliminer la FC12 puisque la concentration finale mesurée est cinq fois inférieure à sa CMC (0,05%). En revanche, pour le DDM, nous mesurons une concentration finale correspondant à sa CMC (0,01%), ce qui suggère qu'une étape de dialyse de 24 heures supplémentaires aurait été nécessaire.

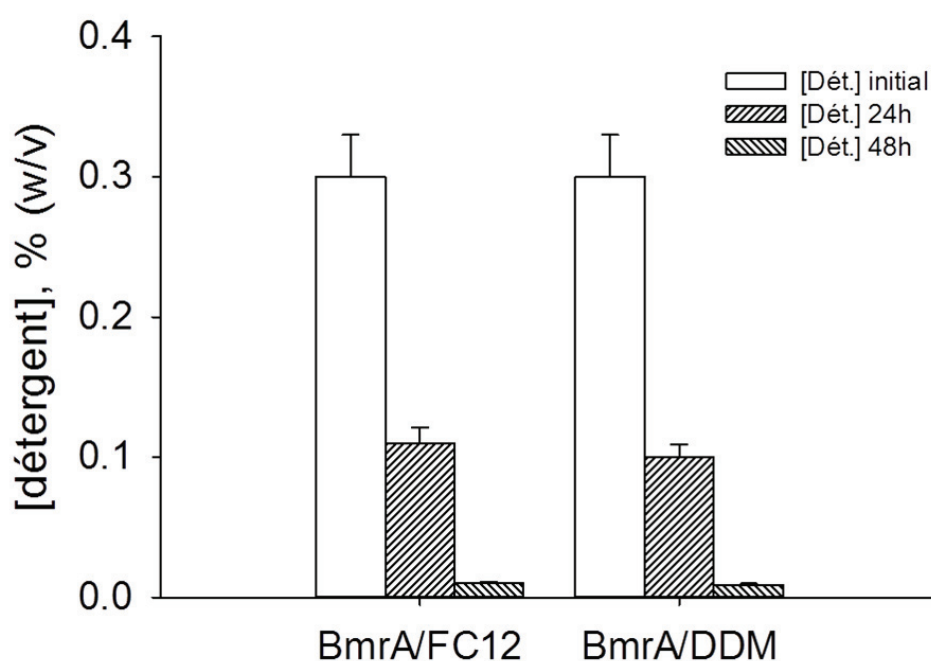
Ce résultat démontre que la spectrométrie de masse de type MALDI-Tof est une méthode très sensible, qui peut remplacer avantageusement l'utilisation de la radioactivité pour doser les détergents.



a)



b)



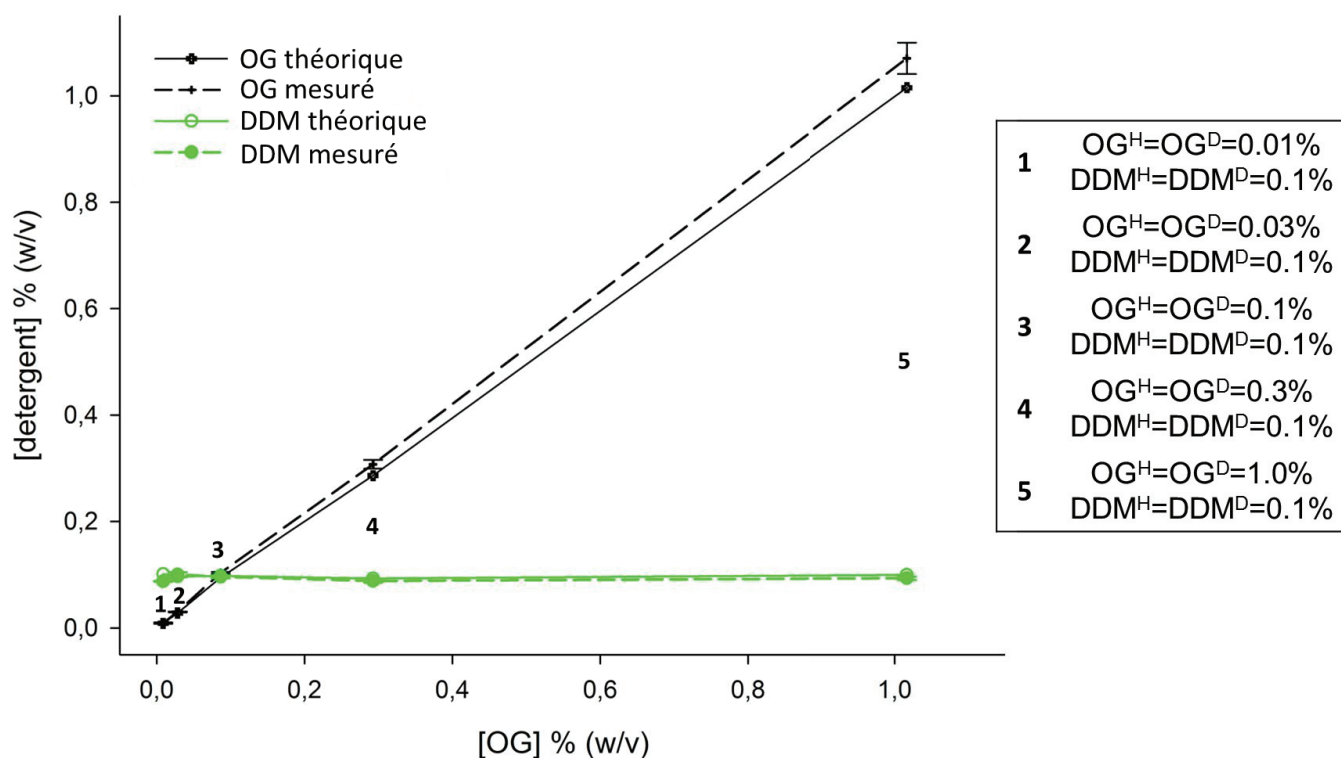
**Figure 108 : Limite de détection des détergents et application à l'étape de dialyse.**

A) Des solutions de DDM ou FC12 préparées respectivement à 0,2 et 0,02%, à un ratio protoné sur deutéré de 0,9 pour le DDM et 1,1 pour la FC12, ont été diluées 10, 100 et 1000 fois pour le DDM et 10, 100 et 500 fois pour la FC12. Ces échantillons ont ensuite été dosés MALDI MS (cercles bleus pour le DDM et carrés rouges pour la FC12). Les traits en pointillé correspondent au ratio théorique. Les concentrations micellaires critiques (CMC) du DDM et

de la FC12 sont indiquées. B) BmrA purifié en FC12 ou DDM est dialysé en présence de lipides, pendant 24 et 48 H dans un boudin de dialyse avec un seuil de perméabilité de 10 000 daltons. Les détergents sont ensuite dosés par MALDI MS en ajoutant du DDM ou de la FC12 deutéré. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de triplicate.

### Quantification des détergents dans un mélange

Afin d'évaluer la capacité de la méthode à quantifier des détergents lorsqu'ils sont mélangés, nous avons dosé des quantités connues d'une solution composée de  $\beta$ -OG et DDM, deux des détergents les plus utilisés pour l'étude structurale des protéines membranaires. La concentration finale de DDM est gardée constante (0,1%) et celle de  $\beta$ -OG varie de 0,01 à 1%. Comme indiqué dans la figure 109 ci-dessous, les deux détergents ont pu être mesurés précisément dans la gamme de concentrations testée. Il est important de noter que le DDM et le  $\beta$ -OG présentent des capacités de désorption assez similaires, ce qui explique pourquoi l'un ne masque pas l'autre au niveau du détecteur. Cependant, en dehors de cette gamme de concentration, nous atteignons la limite de détection du DDM et du  $\beta$ -OG lorsque ces deux détergents sont mélangés. En présence de dix fois plus de  $\beta$ -OG dans l'échantillon (1%), le signal obtenu pour le DDM a tendance à diminuer. La même chose est observée avec le  $\beta$ -OG lorsque ce dernier est dix fois moins concentré que le DDM.



**Figure 109 : Dosage du DDM et du  $\beta$ -OG mélangés par MALDI MS.**

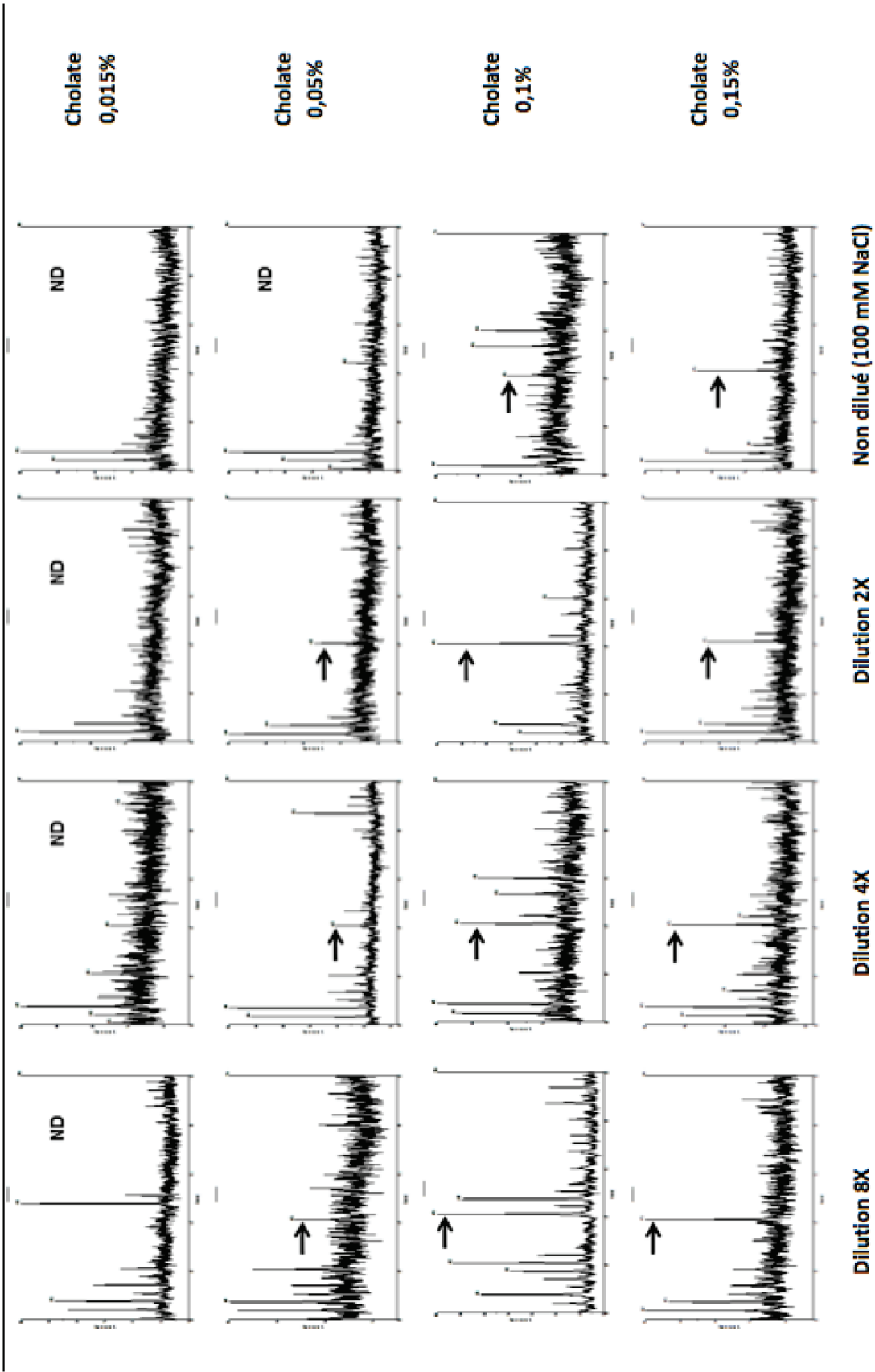
Des solutions de  $\beta$ -OG protoné et deutéré sont mélangées aux concentrations indiquées dans le tableau de droite et 0,1% de DDM protoné et deutéré est ajouté. Le  $\beta$ -OG et le DDM sont ensuite quantifiés par MALDI MS. Les données présentées, en fonction de la concentration en  $\beta$ -OG, sont de couleur

verte pour le DDM et noir pour le  $\beta$ -OG. Les traits en pointillés représentent la concentration théorique attendue et les traits pleins la concentration expérimentale obtenue.

Nous avons ensuite tenté d'appliquer la méthode MALDI-MS pour mesurer le DDM et le sodium cholate lorsque ces deux détergents sont mélangés. Il est tout d'abord intéressant de noter que chaque détergent n'influence pas la désorption de l'autre. Le DDM a ainsi pu être quantifié jusqu'à sa limite de détection. Le cholate en revanche n'a pas pu être dosé en utilisant le désoxycholate comme standard interne. Les différents types de matrice testés conduisent à une trop grande variabilité des ratios cholate/désoxycholate, ce qui ne permet pas d'obtenir une gamme étalon linéaire.

Le problème majeur vient de la présence de NaCl dans le tampon qui influence la désorption des molécules de cholate. La cristallisation de l'échantillon dans la matrice est très hétérogène. Afin de parvenir à estimer la quantité de cholate dans la solution, nous avons comparé pour des concentrations connues de cholate le signal MALDI obtenu en présence de NaCl et après dilutions successives dans l'eau. Comme illustré dans la figure 110, le pic correspondant au cholate est identifié par une flèche noire à un ratio  $m/z$  de 407. Pour une solution à 0,15% de cholate, le pic est observé dans toutes les dilutions testées. En revanche, aucun pic n'est détecté avec une solution de cholate à 0,015%. Les profils des pics obtenus à des concentrations intermédiaires (0,05 et 0,1% de cholate) après dilutions successives dans l'eau sont également illustrés.

A 100 mM de NaCl, le pic de cholate obtenu à 0,1% est de faible intensité comparé à celui obtenu à 0,15% et il est absent à 0,05 et 0,015% de cholate. Lorsque l'on procède à des dilutions en séries dans l'eau, le pic de cholate reste plus élevé à 0,1% qu'à 0,05%. Mais un pic est cette fois détecté à 0,05% légèrement au dessus du bruit de fond. Ces résultats différents démontrent que la désorption du cholate dépend de la concentration en NaCl et du ratio cholate/NaCl. Comme nous le verrons plus tard, cette figure nous a permis d'estimer la concentration en cholate dans des échantillons de P-gp purifié dans des micelles mixtes de DDM-sodium cholate.



**Figure 110 : Influence du NaCl sur la désorption du cholate.**

Des solutions de cholate sont préparées à 0,015, 0,05, 0,1 et 0,15% dans le tampon SEC qui contient 100 mM NaCl puis sont analysées par MALDI MS. Les échantillons sont dilués 2, 4 et 8 fois dans l'eau puis analysés par MALDI MS. Le pic correspondant au cholate est indiqué par une flèche noire et se situe à un ratio m/z de 407. ND : non détecté.

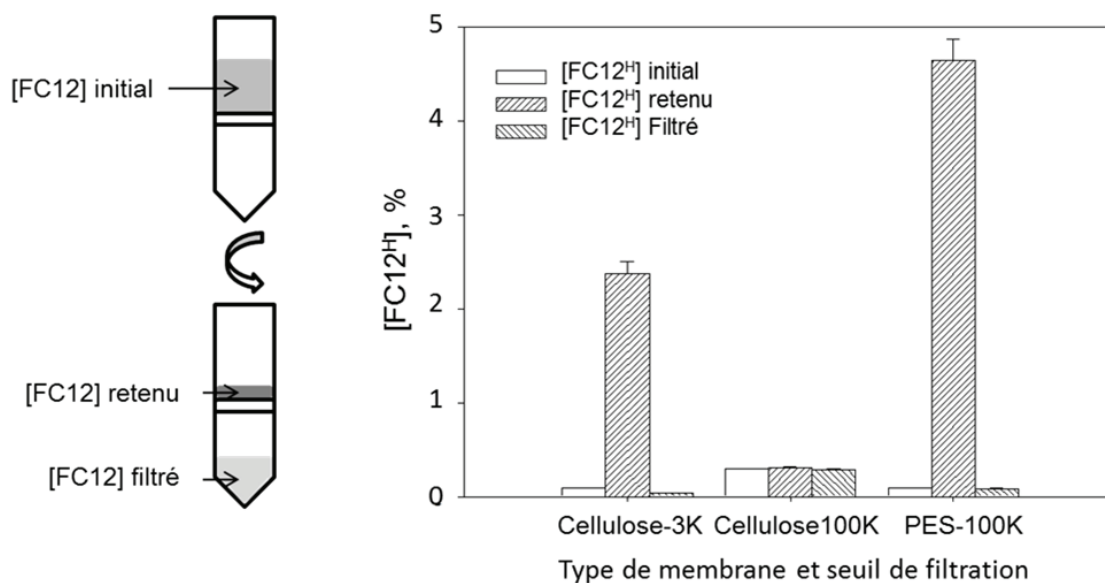
Les systèmes d'ultrafiltration peuvent concentrer les micelles libres de détergent

Réalisé avec le docteur Moez Rhimi. Après purification, les protéines sont en général concentrées plusieurs fois en vue des essais de cristallisation. Idéalement, on utilise des systèmes de concentration avec des seuils de coupure inférieurs à la taille du complexe protéine-détergent et supérieurs à celle des micelles afin d'éliminer le détergent libre. En utilisant la spectrométrie de masse de type MALDI, nous avons tenté de suivre l'évolution de la concentration de la FC12 en fonction du seuil de coupure des membranes, 3 000 et 100 000 daltons et de déterminer l'influence de la nature des membranes, cellulose (Millipore) ou polyéthersulfone (PES, Spin-X UF, Corning), sur la concentration (figure 111). Les concentrations initiales de FC12 sont de 0,1% pour l'essai de filtration sur cellulose 3K et PES 100K et 0,3% pour l'essai cellulose 100K.

Nous avons concentré 25 fois l'échantillon en utilisant des concentrateurs, équipés d'une membrane en cellulose, de 3 et 100 kDa. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 111 ci-dessous. La quantification de la FC12 montre que la concentration de l'échantillon sur filtre cellulose avec un seuil de coupure de 3 000 daltons conduit à accumuler le détergent dans la fraction retenue, dont la concentration passe de 0,1% à 2,38%. Lorsqu'on réalise l'expérience avec le même type de membrane et un seuil de coupure de 100 kDa, on obtient cette fois une concentration en FC12 dans la solution retenue qui n'augmente pas (0,3%). Ce résultat est bien en accord avec la taille attendue des micelles de FC12, comprises entre 20 et 60 kDa (Lipfert et *al.*, 2007). Compte tenu de cette masse moléculaire, il est normal qu'au dessus de sa CMC, la FC12 soit retenue avec un seuil de coupure de 3 000 daltons et ne soit pas accumulée avec un seuil de 100 000 daltons.

Nous avons ensuite réalisé la même expérience, en concentrant cinquante fois l'échantillon avec un concentrateur de 100 kDa équipé d'une membrane de type polyéthersulfone. De manière surprenante, on observe que le détergent s'accumule dans la fraction retenue, qui passe de 0,1% à 4,67%. Malgré un seuil de coupure suffisamment grand pour laisser passer les micelles libres de détergent, celui-ci reste dans la fraction retenue, ce qui suggère que la FC12 interagit fortement avec ce type de matériaux. Notre méthode montre ainsi que dans le cadre des protéines membranaires ce type de concentrateur doit être utilisé avec précaution





**Figure 111 : Compatibilité des différents systèmes d'ultrafiltration avec la FC12.**

A gauche, schéma du principe de l'expérience. Des solutions à 0,1% ou 0,3% (w/v) de FC12 sont concentrées à l'aide de systèmes de filtration de 3 000 et 100 000 daltons, équipés d'une membrane de type cellulose ou polyéthersulfone. La FC12 est ensuite dosée dans chaque fraction (initiale, retenu, filtré) illustrées respectivement dans la figure de droite par des rectangles blancs, des rayures vers la droite ou vers la gauche. Les concentrations initiales de FC12 sont de 0,1% pour l'essai de filtration sur cellulose 3K et PES 100K et 0,3% pour l'essai cellulose 100K.

### En présence de protéines membranaires, la quantité totale de détergent est détectée

Jusqu'à maintenant, nous sommes parvenus à doser le détergent libre en solution. Mais qu'en est-il en présence de protéines ? Une limitation possible de la méthode pourrait être que les protéines qui interagissent avec les détergents interfèrent au niveau de leur détection, ce qui sous-estimerait la quantité de détergent réellement présente et introduirait une erreur dans la mesure. Afin de répondre à cet éventuel problème, nous avons utilisé une protéine soluble, l'albumine de sérum bovin (BSA) qui présente deux avantages : elle est capable de fixer entre sept et vingt molécules de lipide par monomère (Makino et al., 1973; Meyuhas et al., 1995; Reynolds et al., 1967) et contrairement aux protéines membranaires, elle est disponible commercialement sous forme lyophilisée, ce qui permet de mélanger des quantités connues de protéine et de détergent avant quantification par MALDI-MS.

Nous avons ainsi ajouté 0,1% de FC12 à des solutions de BSA à 1 et 30 mg/ml pour déterminer si notre technique détecte toutes les molécules de détergent présentes en solution (liées + libres) ou seulement le détergent libre. A 30 mg/ml, la BSA fixe entre 0,12% (7 molécules) et 0,32% (20 molécules) de FC12. Comme illustré dans la figure 112a ci-dessous, nous n'observons aucune différence entre le contrôle et les échantillons contenant 1 et 30mg/ml

de BSA, ce qui suggère que notre technique permet de doser la quantité totale de FC12 présente.

Afin de valider ce résultat avec une protéine membranaire, nous avons purifié BmrA en FC12 puis avons dosé la quantité de détergent au sein de l'échantillon en absence et présence de 1% de sodium dodécyl sulfate. En dénaturant la protéine, le SDS devrait libérer les molécules de FC12 liées à BmrA, ce qui entraînerait une augmentation de la concentration en FC12 libre. Comme illustré dans la figure 112, ce n'est pas le cas. L'ajout de SDS ne modifie pas la quantité de FC12 détectée, ce qui confirme bien que l'interaction entre la protéine et le détergent est trop faible pour empêcher sa désorption par le laser. L'ensemble de ces résultats démontre bien que la méthode MALDI détecte le détergent présent dans toute la solution.

**a) Dosage de la FC12 en absence et présence de BSA**

Echantillon	Contrôle	BSA 1 mg/ml	BSA 30 mg/ml
[FC12 <sup>H</sup> ] (%)	0.101 ± 0.001	0.098 ± 0.003	0.103 ± 0.004

**b) Dosage de la FC12 liée à BmrA en absence et présence de 1% SDS**

BmrA 11 mg/ml	Contrôle	+ 1% SDS
[FC12 <sup>H</sup> ] (%)	2.57 ± 0.13	2.59 ± 0.13

**Figure 112 : La méthode MALDI MS dose la quantité totale de détergent présent.**

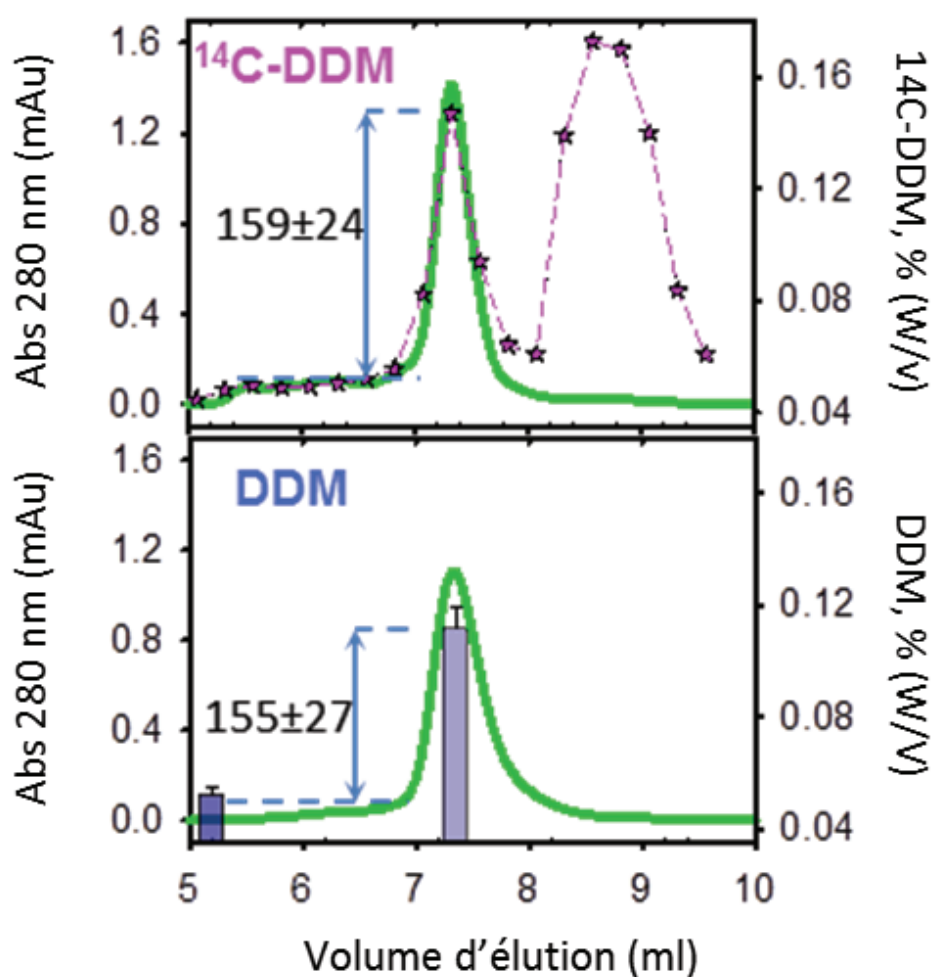
A) La BSA à 1 ou 30 mg/ml est incubée avec 0,1% de FC12 pendant 30 minutes. La foscholine 12 est ensuite dosée par MALDI MS. Comme contrôle, la même expérience est réalisée en remplaçant la FC12 par de l'eau. B) BmrA est purifié en FC12 puis incubé en absence et présence de 1% SDS pendant 30 minutes. La quantité de FC12 présente est ensuite dosée par MALDI MS.

**Précision de la méthode**

Afin d'évaluer la précision de notre méthode, nous l'avons comparé à celle développée en 2008 par le Pr. le Maire (le Maire et *al.*, 2008), qui est basée sur l'utilisation de la radioactivité pour doser les détergents. Cette méthode a principalement été utilisée avec le DDM radiomarké (<sup>14</sup>C-DDM) et la protéine SERCA1a, une ATPase membranaire composée de dix passages transmembranaires qui transporte le calcium.

Réalisé par le docteur Cédric Montigny (équipe le Maire) pour la partie radioactive. Les membranes enrichies en SERCA1a ont été solubilisées en présence de <sup>14</sup>C-DDM et les

protéines extraites ont ensuite été soumises à deux chromatographies d'exclusion-diffusion successives (cf partie matériel et méthodes). La première permet d'éliminer les agrégats, les lipides et le détergent libre en excès. La seconde nous a permis d'évaluer précisément la quantité de  $^{14}\text{C}$ -DDM associée à la protéine (figure 113, panneau du haut). En parallèle, nous avons réalisé la même expérience en utilisant du DDM non marqué (Figure 113, panneau du bas). La radioactivité nous a permis d'estimer que  $159 \pm 24$  molécules de DDM sont associées à une molécule de SERCA1a. En dosant le DDM par MALDI-MS, nous avons déterminé  $155 \pm 27$  molécules de DDM par molécule de SERCA1a. Ce résultat démontre donc que la méthode MALDI est aussi précise que la radioactivité pour doser les détergents.



**Figure 113 : Dosage du DDM associé à SERCA1a par radioactivité et MALDI MS.**

Les membranes enrichies en SERCA1a sont solubilisées en présence de DDM puis les protéines extraites sont soumises à deux chromatographies d'exclusion diffusion consécutives avec du  $^{14}\text{C}$ -DDM ou du DDM non marqué. Les fractions correspondant au pic d'élution sont rassemblées et le DDM est dosé par radioactivité (panneau du haut) ou MALDI MS (panneau du bas).

## Dosage du détergent associé à BmrA et mP-gp purifiés

Nous avons essayé de quantifier la concentration de détergent libre et associée à BmrA à différentes étapes de sa purification afin de comprendre comment les molécules de détergent s'organisent autour de la protéine. Pour avoir une vision plus globale de cette interaction, nous avons testé trois détergents différents : la FC12, le DDM et le LMNG, qui partagent la même longueur de chaîne aliphatique mais des nombres d'agrégation et des tailles de micelle différentes (figure 114b et cf partie bibliographique).

Comme illustré dans la figure 114a, BmrA a été extrait puis purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (IMAC). La concentration de détergent contenue dans le pool d'élution de BmrA a été dosée par MALDI MS (tableau 19) puis l'échantillon a été concentré jusqu'à 500 µl sur membrane d'ultrafiltration 50 kDa. La fraction concentrée a été déposée sur colonne de gel filtration de type surperdex 200. La quantité de détergent contenue dans les fractions d'élution a ensuite été dosée par MALDI MS. Contrairement à l'expérience réalisée avec SERCA1a, il n'est cette fois pas nécessaire de réaliser deux chromatographies d'exclusion diffusion consécutives car les agrégats, les lipides et l'excès de détergent qui résulte de l'extraction de BmrA sont éliminés lors de la chromatographie d'affinité. Parallèlement, les mêmes étapes chromatographiques d'affinité, concentration, gel filtration et dosage de détergent par MALDI MS ont été réalisées dans les mêmes conditions en absence de protéine. La chromatographie d'exclusion diffusion couplée à la méthode MALDI MS nous ont ainsi permis de repérer la zone d'élution du détergent libre, injecté soit seul soit en complexe avec la protéine, d'autre part d'estimer sa concentration dans ces deux situations et enfin, de déterminer le ratio détergent-protéine des fractions éluées.

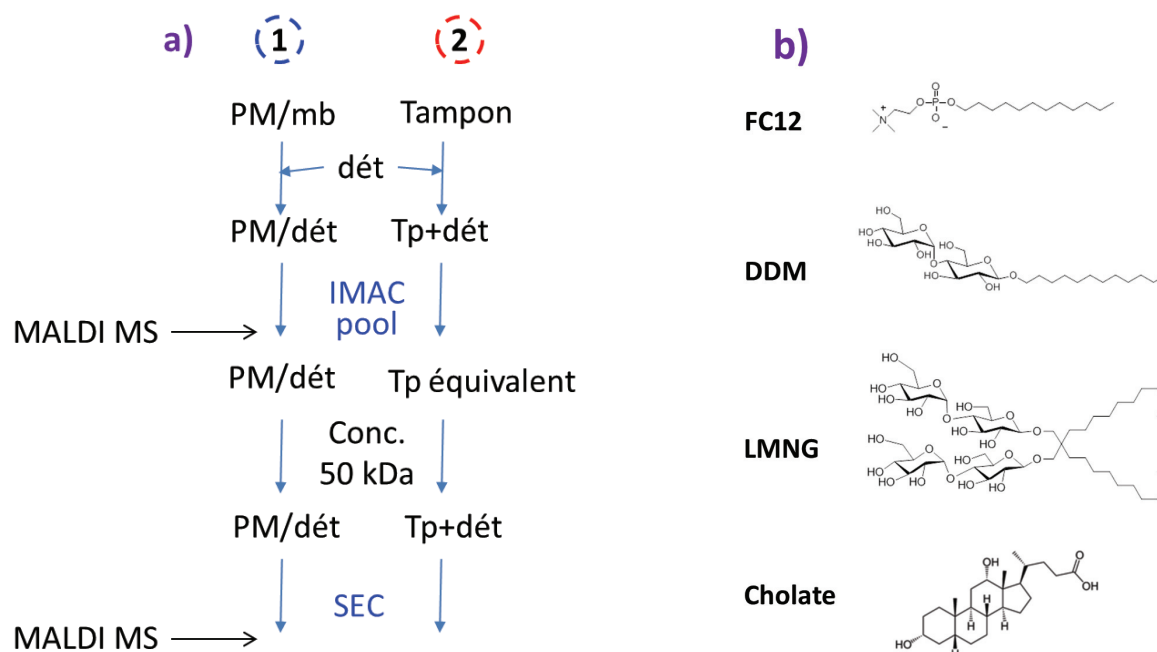


Figure 114 : Dosage de la quantité de détergent libre et liée

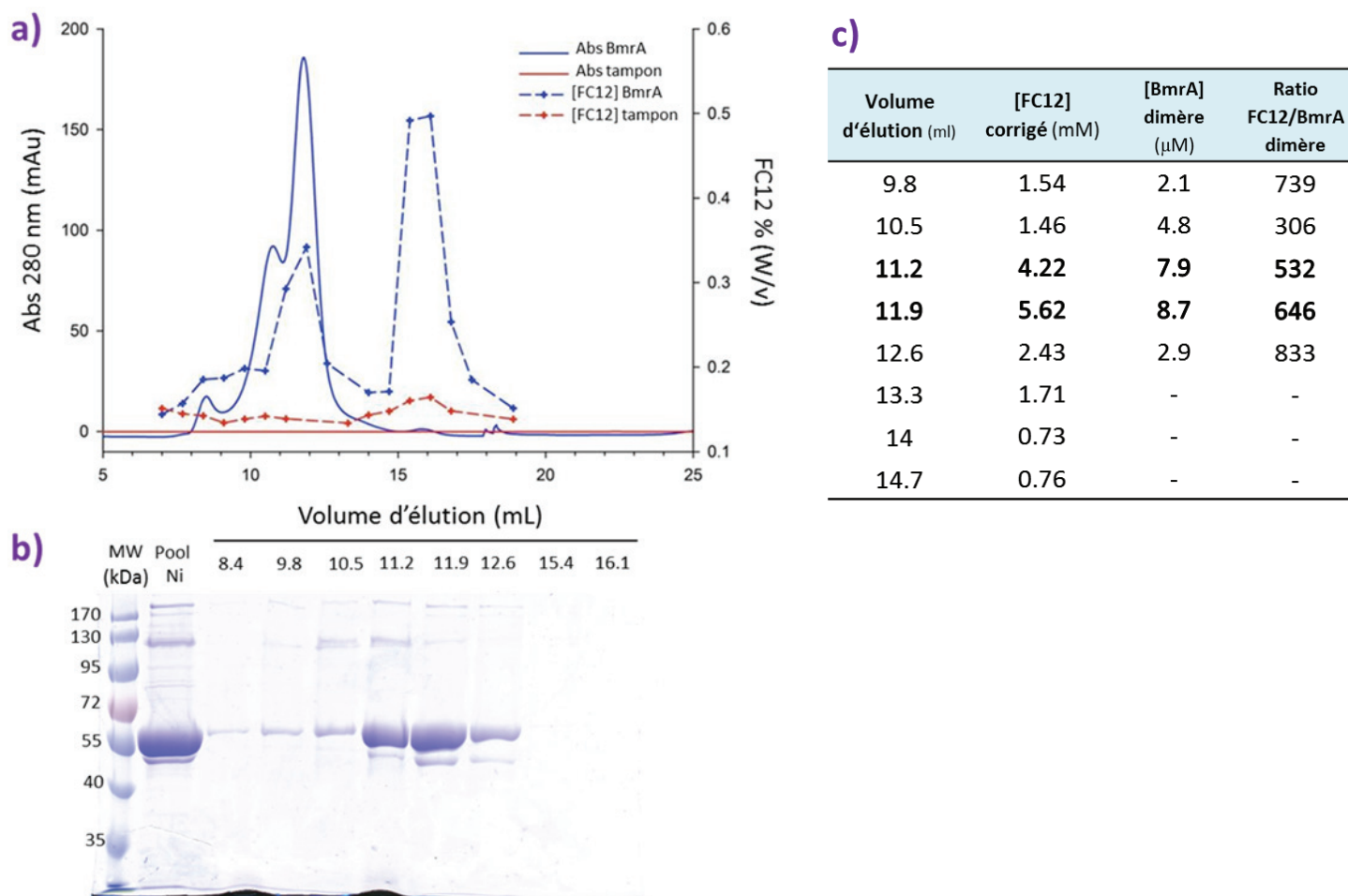
### à BmrA pendant sa purification.

A) Schéma du principe de l'expérience. BmrA est extrait en FC12, DDM ou LMNG puis purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. Le détergent contenu dans le pool de BmrA est dosé par MALDI MS. L'échantillon est concentré sur 50 kDa jusqu'à 500 µl puis injecté sur colonne de gel filtration de type superdex 200. La concentration de détergent contenue dans chaque fraction d'élution est dosée par MALDI MS. Parallèlement, les mêmes étapes de chromatographies et de dosage sont réalisées avec le tampon seul. PM : protéine membranaire ; dét. : détergent ; Tp : tampon. B) Structure chimique des détergents utilisés lors de cette étude.

#### ➤ La foscholine 12

Comme illustré dans la figure 115a ci-dessous, le complexe BmrA-FC12 détecté à 280 nm (tracé solide bleu) est élué à 11,5 mL. Le premier pic visible à 10,5 ml correspond à la protéine contaminante OmpF (Wiseman, Kilburg et *al.*, 2014). La masse moléculaire du dimère de BmrA est de 130 000 daltons. Les étalons de masse moléculaire (cf matériel et méthodes) nous ont permis d'estimer que le pic d'élution de BmrA est centré sur 300 000 daltons, ce qui suggère que la masse moléculaire de détergent associé est de  $300\,000 - 130\,000 = 170\,000$  daltons. Compte tenu de la masse moléculaire de la FC12, 352 g/mol, on en déduit qu'environ 490 molécules de détergent ( $170\,000/352$ ) sont associées à chaque dimère de BmrA.





**Figure 115 : Dosage de la FC12 libre et liée à BmrA après gel filtration sur Superdex 200.**

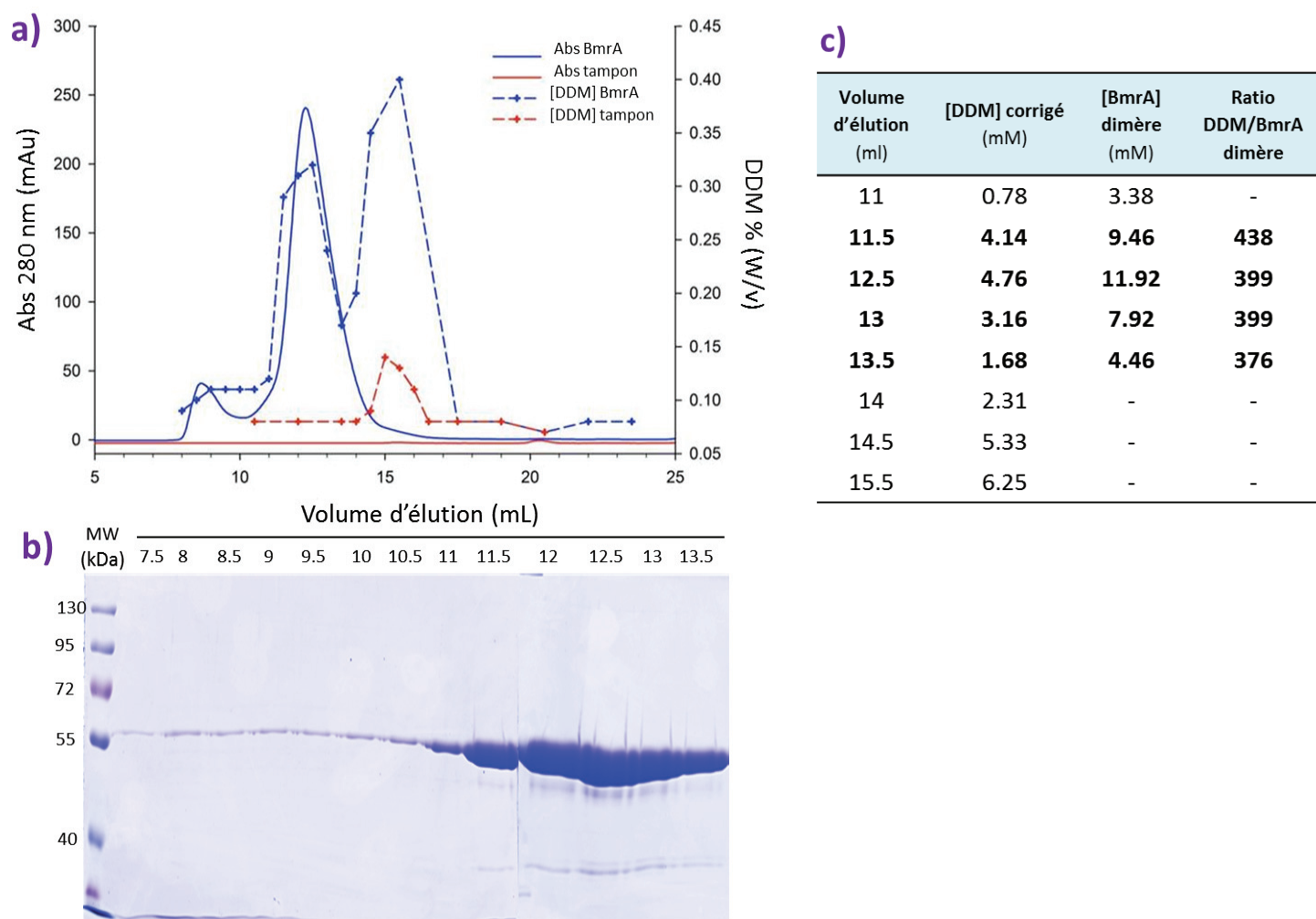
A) L'absorbance des fractions éluées est mesurée à 280 nm pour quantifier la protéine (trait plein et axe des ordonnées de gauche) et la concentration de FC12 (traits en pointillé et axe des ordonnées de droite) est déterminée avec (bleu) et sans protéine (rouge) par MALDI MS. B) gel SDS-PAGE 10% des fractions de la chromatographie d'exclusion diffusion. C) Dosage de la FC12 associée à BmrA purifié. [FC12] corrigé correspond à la différence entre la concentration de détergent entre l'échantillon protéique et son tampon traité à l'identique. Le ratio FC12/BmrA correspond au rapport [FC12] lié sur concentration du dimère de BmrA.

Un troisième pic d'élution est détecté à 280 nm à 16,2 mL, correspondant à une masse moléculaire de 30 000 daltons, bornée entre 20 000 et 60 000 daltons. Le dosage par MALDI permet de déterminer qu'il s'agit de la foscholine 12 libre sous forme micellaire (tracé en pointillé), qui est élue majoritairement à ce volume avec (tracé bleu) ou sans protéine (tracé rouge). On peut cependant noter que la concentration de foscholine 12 libre est beaucoup plus importante en présence qu'en absence de BmrA. Ceci suggère que la FC12 s'accumule dans le concentrateur en présence de protéine malgré un seuil de coupure (50 kDa) inférieur à la taille des micelles (30 kDa). La méthode MALDI nous a également permis de détecter et doser la foscholine 12 associée à BmrA (premier pic du tracé en pointillé

bleu). Les données, présentées dans la figure 115c, indiquent que le complexe contient  $589 \pm 60$  molécules de FC12 par dimère de BmrA.

#### ➤ Le DDM

Le complexe BmrA-DDM détecté à 280 nm (figure 116a, tracé plein en bleu) est élué à 12,5 ml. Un second pic d'élution est détecté à 15 ml, correspondant à une masse moléculaire de 60 kDa, bornée entre 80 000 et 30 000 daltons. La méthode MALDI nous a permis de déterminer qu'il s'agit de micelles libres de DDM qui sont éluées à ce volume. Comme pour la foscholine 12, on remarque que la concentration de DDM libre est cinq fois plus élevée en présence de protéine. Il est logique que le DDM s'accumule dans le concentrateur étant donné que la taille de sa micelle est supérieure au seuil de coupure des membranes. Mais dans tous les cas il est surprenant de constater une telle différence en absence et présence de BmrA. Enfin, la méthode MALDI nous a permis de doser le DDM associé à la protéine (pic en pointillé bleu élué à 12,5 ml). La figure 116c indique que  $412 \pm 40$  molécules de DDM sont associés à chaque dimère de BmrA. Une étude équivalente réalisée en utilisant du [ $^{14}\text{C}$ ]DDM avec BmrA extrait et purifié avec du DDM a permis d'aboutir à la conclusion que  $380 \pm 150$  molécules de DDM sont associées au dimère (Ravaud et *al.*, 2006), un chiffre très proche de celui que nous avons mesuré.



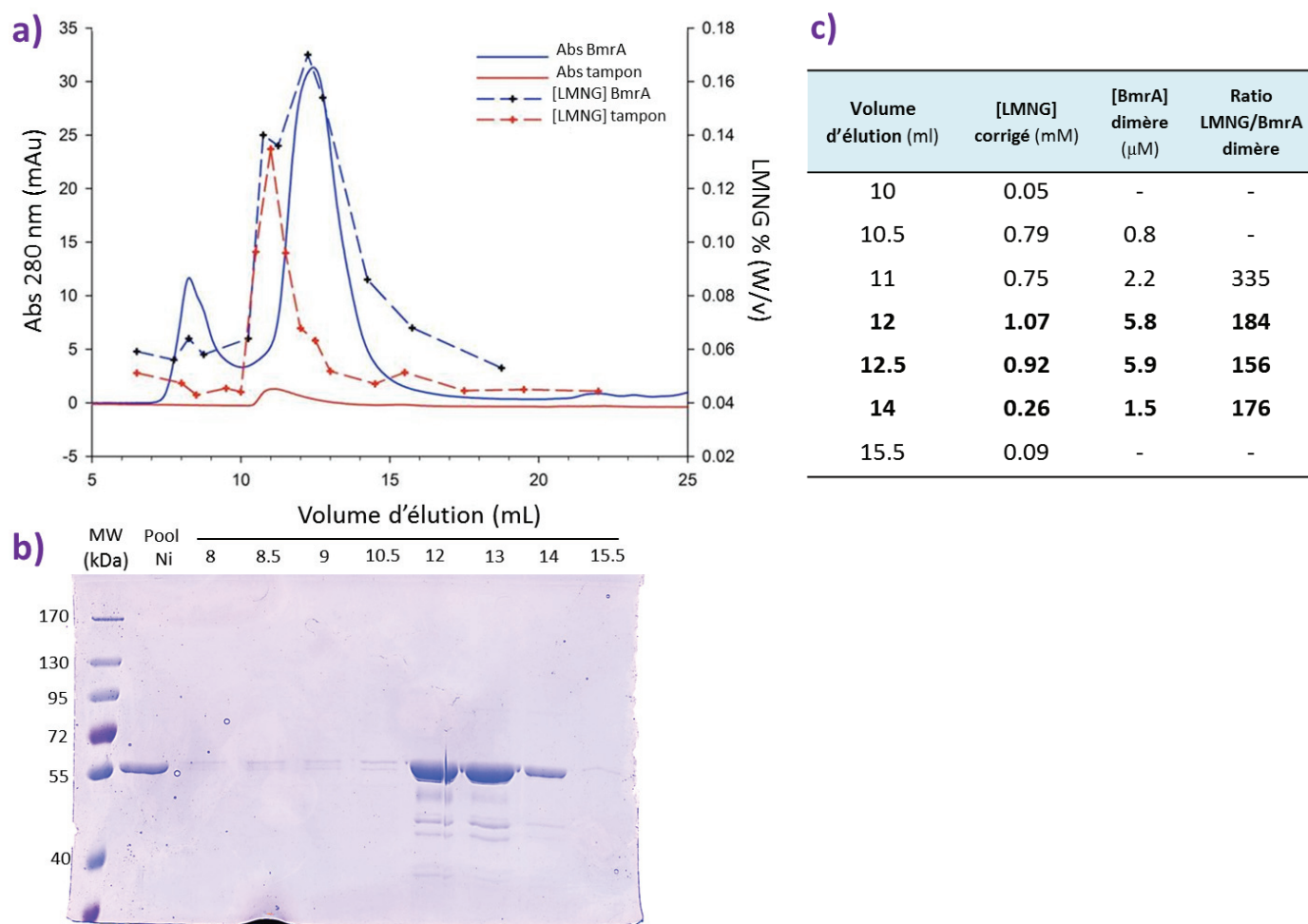
**Figure 116 : Dosage du DDM libre et lié à BmrA après gel filtration sur Superdex 200.**

A) L'absorbance des fractions éluées est mesurée à 280 nm pour quantifier la protéine (trait plein et axe des ordonnées de gauche) et la concentration de DDM (traits en pointillé et axe des ordonnées de droite) est déterminée avec (bleu) et sans protéine (rouge) par MALDI MS. B) gel SDS-PAGE 10% des fractions de la chromatographie d'exclusion diffusion. C) Dosage du DDM associé à BmrA purifié. [DDM] corrigé correspond à la différence entre la concentration de détergent entre l'échantillon protéique et son tampon traité à l'identique. Le ratio DDM/BmrA correspond au rapport [DDM] lié sur concentration du dimère de BmrA.

## ➤ Le LMNG

Comme illustré dans la figure 117a ci-dessous, le complexe BmrA-LMNG est élué à 280 nm entre 12 et 12,5 ml. La méthode MALDI nous a permis de déterminer que ce complexe est composé de  $167 \pm 15$  molécules de LMNG par dimère de BmrA (figure 117c). De manière surprenante, on observe que les micelles de LMNG libres (pointillé bleu) sont éluées avant le complexe BmrA-LMNG, en un pic centré sur 11 ml et retardé jusqu'à 13 ml. Le même phénomène a déjà été observé avec le LDAO (Strop et *al.*, 2005) pour lequel les auteurs ont conclu à l'interaction des micelles avec la résine de silice. Cela pourrait également

être le cas ici étant donné que le dextrane qui compose la résine de la colonne possède des groupements hydroxyles qui pourraient interagir via des liaisons hydrogènes avec la tête polaire des micelles de LMNG.



**Figure 117 : Dosage du LMNG libre et lié à BmrA après gel filtration sur Superdex 200.**

A) L'absorbance des fractions éluées est mesurée à 280 nm pour quantifier la protéine (trait plein et axe des ordonnées de gauche) et la concentration de LMNG (traits en pointillé et axe des ordonnées de droite) est déterminée avec (bleu) et sans protéine (rouge) par MALDI MS. B) gel SDS-PAGE 10% des fractions de la chromatographie d'exclusion diffusion. C) Dosage du LMNG associé à BmrA purifié. [LMNG] corrigé correspond à la différence entre la concentration de détergent entre l'échantillon protéique et son tampon traité à l'identique. Le ratio LMNG/BmrA correspond au rapport [LMNG] lié sur concentration du dimère de BmrA.

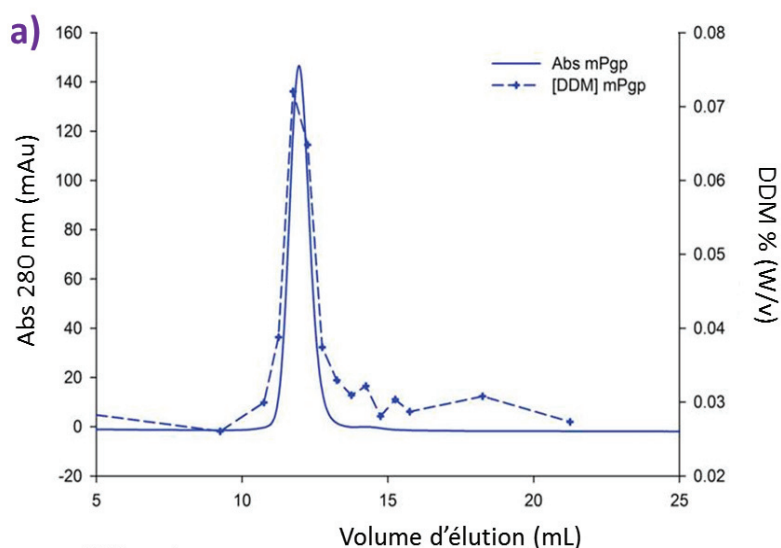
Le volume d'élution du LMNG libre suggère que la taille de sa micelle est importante, comprise entre 380 et 160 kDa. Contrairement au DDM et à la FC12, on observe cette fois que la concentration de LMNG libre est la même en absence et présence de BmrA, ce qui était assez prévisible étant donné la taille élevée de sa micelle. Le pic d'élution du LMNG libre est

très proche de celui du complexe BmrA-LMNG, ce qui signifie que le pool de BmrA contiendra un excès de détergent qui est néfaste pour les expériences de cristallogénèse.

Enfin, de manière intéressante, on observe pour les trois détergents testés que le pic d'agrégats à 8 ml contient des quantités infimes de détergent, ce qui suggère qu'ils sont très majoritairement constitués de protéine.

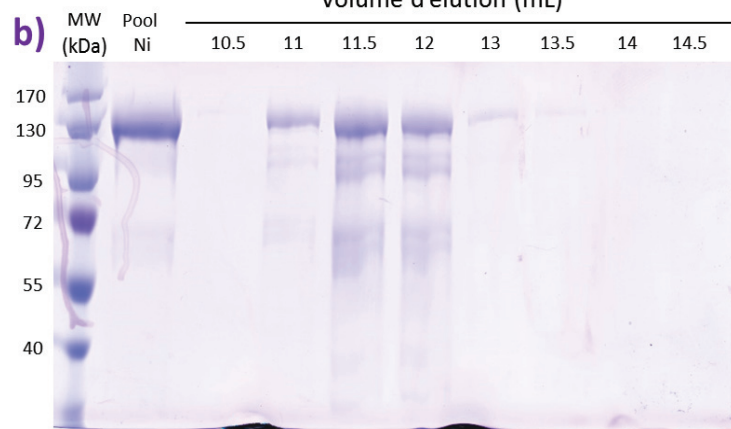
### ➤ DDM/sodium cholate

Afin de déterminer la composition des micelles mixtes de DDM/sodium cholate, nous avons injecté la glycoprotéine-P de souris purifiée (fournie par Lorena Martinez en stage exploradoc dans l'équipe du Pr. G. Chang) sur colonne de gel filtration de type Superdex 200 (cf matériel et méthodes). Le chromatogramme présenté dans la figure 118a montre que la P-gp est éluée à 12 ml, comme le dimère de BmrA. Le dosage du DDM par MALDI MS indique que  $193 \pm 11$  molécules sont associées par monomère de P-gp, environ moitié moins de ce que nous avons obtenu précédemment pour BmrA et BmrC/D purifiés en DDM seul (cf tableau 19).



**c)**

Volume d'élution (ml)	[DDM] corrigé (mM)	[mPgp] monomère (mM)	Ratio DDM/mPgp monomère
10.5	0.00	-	-
11	0.16	1.26	124
<b>11.5</b>	<b>0.81</b>	<b>4.35</b>	<b>186</b>
<b>12</b>	<b>0.67</b>	<b>3.3</b>	<b>201</b>
12.5	0.13	1.19	108
13	0.04	0.4	-
13.5	0.001	-	-



**Figure 118 : Dosage du DDM libre et lié à mP-gp après gel filtration sur Superdex 200.**

A) L'absorbance des fractions éluées est mesurée à 280 nm pour quantifier la protéine (trait plein et axe des

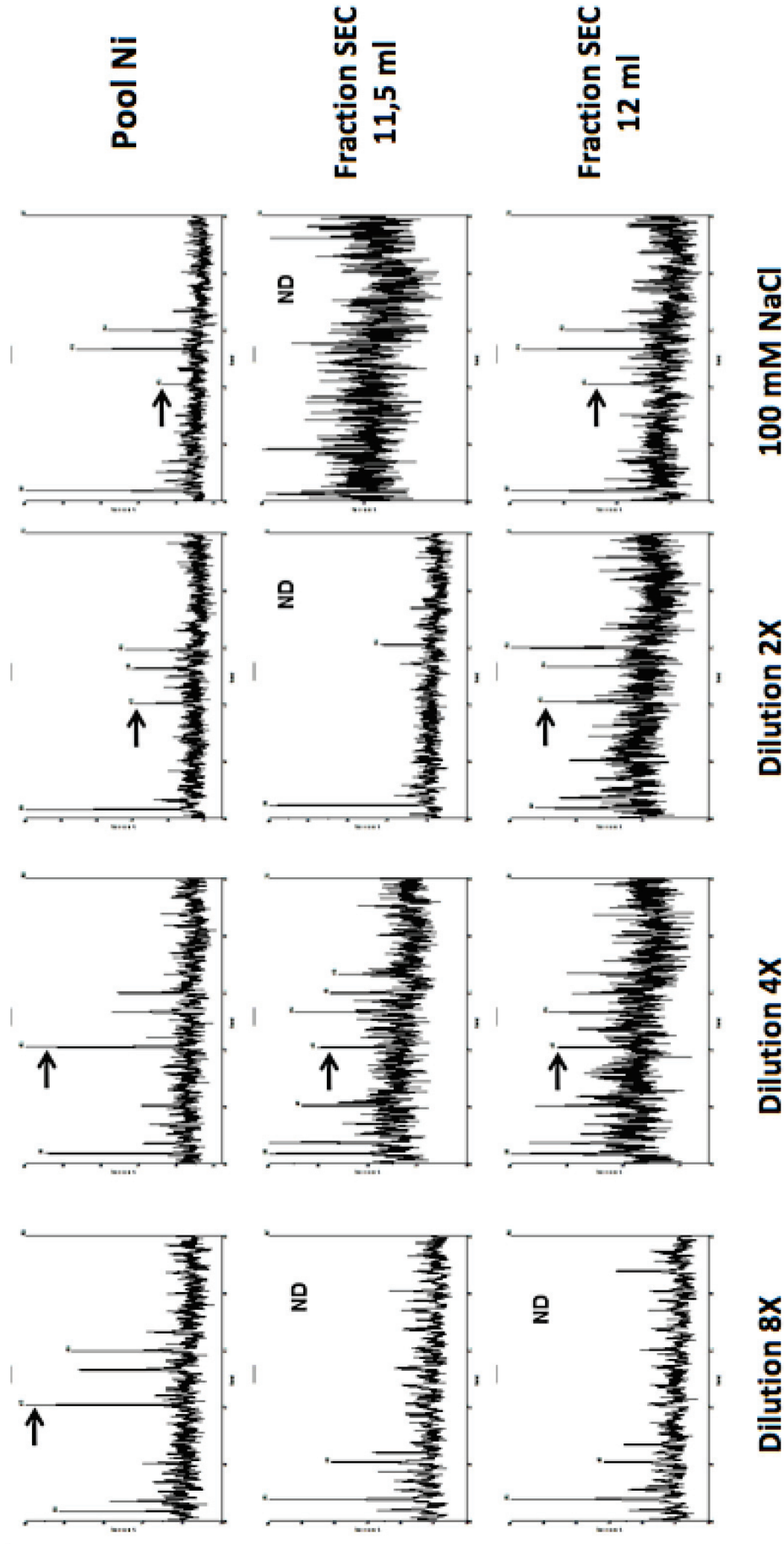


ordonnées de gauche) et la concentration de DDM liée à la protéine (traits en pointillé bleu et axe des ordonnées de droite) est déterminée par MALDI MS. B) gel SDS-PAGE 10% des fractions de la chromatographie d'exclusion diffusion. C) Dosage du DDM associé à BmrA purifié. [DDM] corrigé correspond à la différence entre la concentration de détergent entre l'échantillon protéique et son tampon traité à l'identique. Le ratio DDM/mP-gp correspond au rapport [DDM] lié sur concentration du monomère de mP-gp.

Etant donné que le cholate est présent dans les tampons de purification, une micelle mixte de détergent est donc attendue. Comme nous l'avons vu précédemment, le NaCl influence la désorption du cholate. Nous ne sommes ainsi pas capables de mesurer précisément sa concentration mais seulement d'en donner une estimation.

Nous sommes parvenus à estimer la concentration de cholate dans l'échantillon en comparant les profils de désorption obtenus à différentes concentrations de NaCl (figure 119). La détection d'un pic à un rapport  $m/z = 407$  démontre clairement la présence de cholate dans l'échantillon. Pour le pool de BmrA issu de la chromatographie d'affinité, nous observons à 100 mM NaCl un pic à 407 de faible intensité. Celle-ci augmente de manière significative lorsque l'on réduit la concentration en sels.

Ce profil correspond donc à celui observé pour une concentration de 0.1% de cholate (cf figure 110). Pour les deux fractions (élues à 11,5 et 12 ml) correspondant aux têtes de pic de la chromatographie d'exclusion diffusion, le profil de désorption correspond à une concentration de cholate comprise entre 0,05% et 0,015%. Nous pouvons donc estimer que le complexe P-gp-DDM-cholate est composé de  $100 \pm 50$  molécules de cholate et  $193 \pm 11$  molécules de DDM.



**Figure 119 : Désorption du cholate dans les échantillons de mP-gp purifié.**

Les échantillons ont été traités comme décrit dans la figure 110. Le pic correspondant au cholate est indiqué par une flèche noire et se situe à un ratio  $m/z$  de 407. ND : non détecté.

## Dosage du détergent lié à d'autres protéines membranaires

Afin de montrer que la méthode MALDI MS est applicable à toutes les protéines membranaires, nous avons déterminé la quantité de différents détergents associée à six protéines membranaires de topologie, fonction et état oligomérique différents. Les protéines autres que BmrA ont été préparées par nos collaborateurs comme décrit dans Matériel & Méthodes :

- ⊕ **BmrA** : un transporteur ABC procaryote de *Bacillus subtilis*, 65 kDa, dimérique, extrait et purifié en FC12, DDM et LMNG.
- ⊕ **BmrC/D** : un transporteur ABC procaryote de *Bacillus subtilis*, hétérodimérique, extrait et purifié en DDM.
- ⊕ **mP-gp** : un transporteur ABC humain, 130 kDa, monomérique, extrait en triton X-100 et purifié en DDM-sodium cholate.
- ⊕ **hAAC1** : un échangeur ADP/ATP humain, 30 kDa, monomérique, extrait et purifié en FC12.
- ⊕ **OprM** : une protéine du système d'efflux MexA-B/OprM de *Pseudomonas aeruginosa* procaryote, 150 kDa, extrait et purifié en octyl  $\beta$ -glucoside et DDM.
- ⊕ **hP2Y1r** : un récepteur purinergique humain à sept passages transmembranaires, 72 kDa, monomérique, extrait et purifié en DDM.

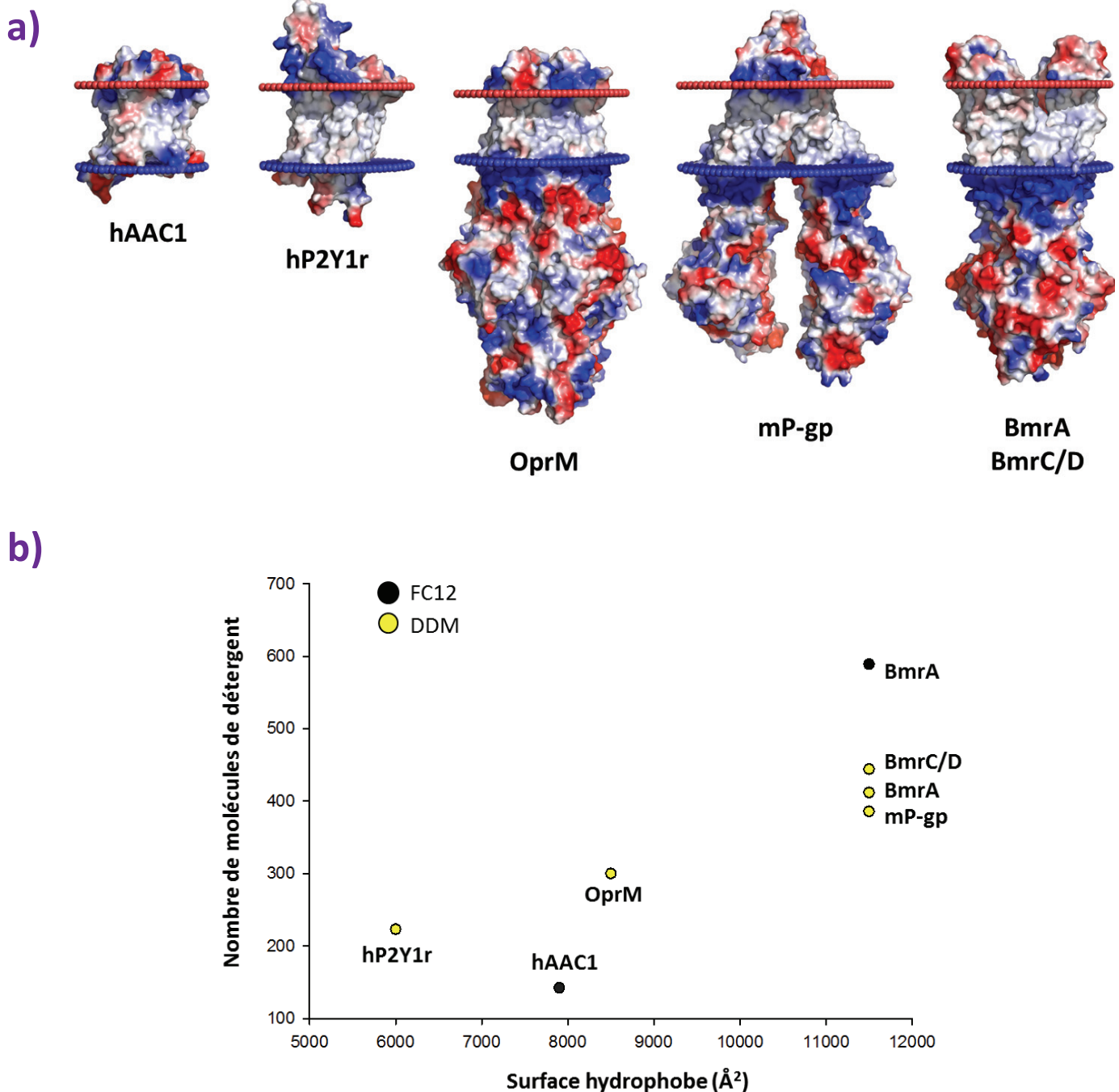
Le protocole de purification utilisé pour chaque protéine est détaillé dans la partie matériel et méthodes. Le tableau 19 ci-dessous synthétise l'ensemble des résultats obtenus dans cette expérience. Ainsi, une molécule de hAAC1 est associée à  $128 \pm 13$  molécules de FC12 et le dimère de BmrC/D est complexé à  $451 \pm 8$  molécules de DDM. Le monomère de hP2Y1r est co-purifié avec  $223 \pm 6$  molécules de DDM et le trimère d'OprM avec  $709 \pm 16$  molécules d'OG.

Le serveur OPM (Orientations of Proteins in Membranes) (Lomize, Pogozheva et *al.*, 2012) nous a permis de prédire la position de chaque protéine au sein de la membrane. Comme illustré dans la figure 120a ci-dessous, on observe que la taille de cette dernière varie de manière significative. Ainsi, OprM qui est situé dans la membrane externe de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* possède une hauteur de membrane beaucoup plus petite par rapport à des protéines comme hAAC1 et hP2Y1r, situées respectivement dans la membrane interne mitochondriale et la membrane plasmique. Connaissant les délimitations de chaque membrane, nous avons pu en déduire à l'aide du logiciel Naccess (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/naccess/nacdownload.html>) la surface hydrophobe de chaque protéine. La représentation graphique du nombre de molécules de détergent associée à chaque protéine en fonction de sa surface hydrophobe est illustrée dans la figure 120b. Pour un type de détergent donné, le nombre de molécule lié augmente avec la taille de la surface hydrophobe à couvrir. Ce résultat paraît effectivement logique mais il n'avait jusqu'à présent jamais été montré dans la littérature. On remarque également que le nombre de molécules de DDM associée aux trois transporteurs ABC mP-gp (386), BmrA (412) et BmrC/D (444) reste globalement le même.

Prot.	Etat oligomérique	Dét.	Nbre de résidus (kDa)	Essai	[BmrA] (μM)	[Dét.] lié (mM)	Ratio Dét./Prot. (mol/mol)
BmrA	Homodimère	FC12	2 x 590 (130)	IMAC pool	12,3	5,7	463 ± 18
				IMAC tête de pic	2,7	1,2	457 ± 17
				SEC pool	8,35	4,92	589 ± 60
				DDM			
				IMAC pool	7,5	2,5	328 ± 8
				SEC tête de pic	11,9	1,55	399 ± 30
				SEC pool	9,54	3,67	412 ± 40
		LMNG		IMAC pool	2,5	0,45	176 ± 28
				IMAC tête de pic	4,4	0,75	138 ± 11
				SEC pool	4,4	0,92	167 ± 15
				SEC tête de pic	5,9	0,92	156 ± 9
BmrC/D	Hétérodimère	DDM	585 + 673 (138,4)	IMAC tête de pic	34,5	15,9	459 ± 12
				SEC tête de pic	2,5	1,1	444 ± 12
mP-gp	Monomère	DDM & cholate	1280 (141,5)	SEC chargé	18,8	2,78	159 ± 15 & 100 ± 50
				SEC pool	3,8	0,74	193 ± 11 & 100 ± 50
hAAC1	Monomère	FC12	338 (30)	SEC tête de pic	1,5	0,2	127 ± 5
				SEC pool	30	4,3	142 ± 5
				SEC pool concentré 20X	90	10,4	115 ± 4
OprM	Trimère	OG	3 x 474 (156,3)	IMAC pool	2,3	1,7	709 ± 16
		DDM		SEC pool	38	11,4	300 ± 6
hP2Y1r	Monomère	DDM	268 (30,3)	Desalting (pool concentré 4X)	27,8	6,2	223 ± 6

**Tableau 19. Dosage du détergent associé à différentes protéines membranaires purifiées.**

Les protéines sont listées dans la colonne de gauche (Prot.). La colonne Dét. correspond au détergent utilisé. [dét.] lié correspond à la différence entre la concentration de détergent entre l'échantillon protéique et son tampon traité à l'identique. Le ratio Dét./prot. correspond au rapport [détergent] lié sur [protéine].



**Figure 120 : Quantification du détergent associé à différentes protéines membranaires.**

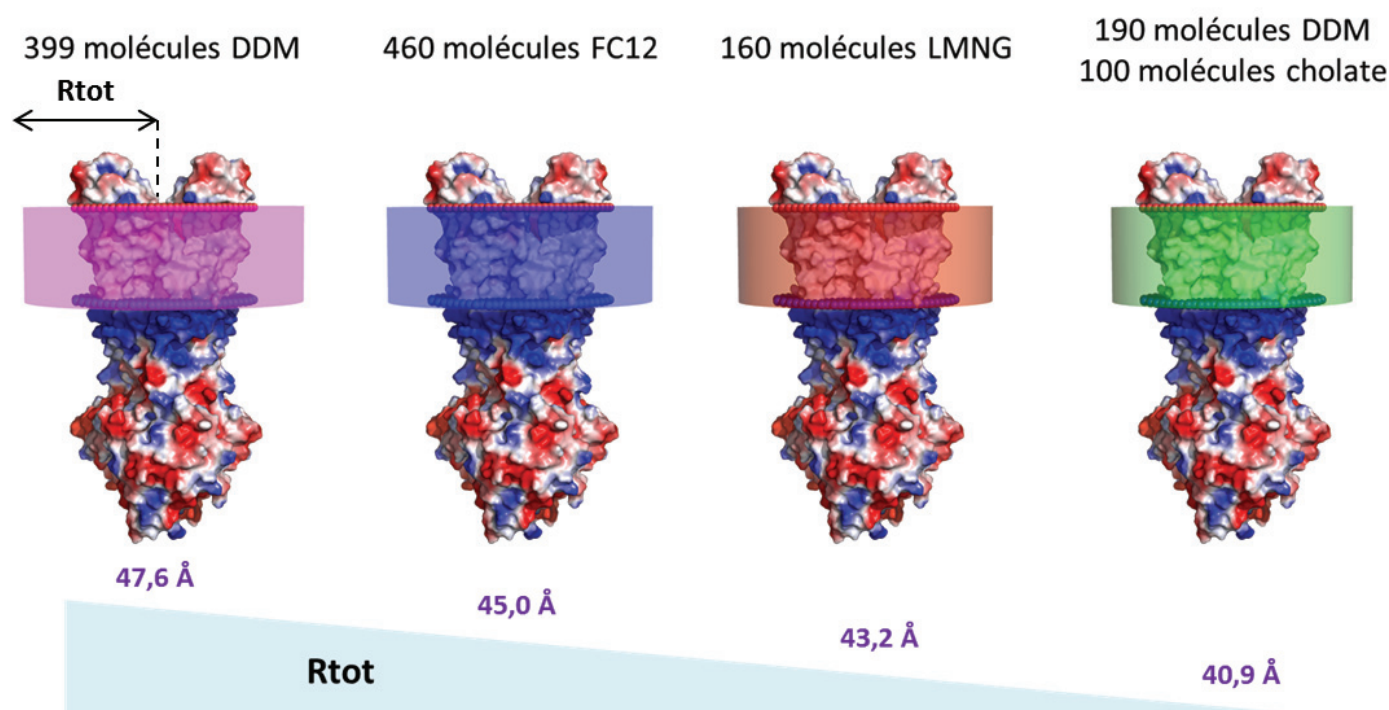
A) Estimation de la taille de la membrane des six protéines membranaires étudiées. Le serveur OPM (Orientations of Proteins in Membranes) mis en ligne par l'université du Michigan (<http://opm.phar.umich.edu/server.php>) permet de prédire l'orientation des protéines au sein de la membrane (Lomize, Pogozheva et al., 2012). Connaissant l'épaisseur de chaque membrane, nous avons pu en déduire la surface hydrophobe des protéines à l'aide du logiciel Naccess (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/naccess/nacdownload.html>). B) Représentation du nombre de molécules de détergent lié à une protéine en fonction de la taille de sa surface hydrophobe. Les cercles colorés en noir correspondent à la FC12 et ceux en jaune au DDM.



## La taille de la ceinture de détergent associée à BmrA

Grâce à la méthode MALDI-MS, nous avons déterminé le nombre de molécules de détergent associées à BmrA (589 pour la FC12, 412 avec le DDM, 156 avec le LMNG et 193 molécules de DDM associées à 100 molécules de cholate pour la micelle mixte de DDM-sodium cholate). La question qui se pose maintenant est de savoir quelles sont les dimensions de la ceinture de détergent associé à BmrA.

En assimilant le complexe BmrA-détergent à une couronne cylindrique, nous sommes parvenus à estimer le rayon de la ceinture de détergent associé à la protéine (cf partie matériel et méthodes). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 121. On observe que le cholate permet de réduire d'environ 7 Å la taille de la couronne de détergent (47,6 Å) par rapport à celle de DDM seul (40,9 Å). La FC12 et le LMNG conduisent à des ceintures de taille intermédiaire de respectivement 45,0 Å et 43,2 Å. Ces résultats rejoignent ceux de Varade et *al.*, publiés en 2004. L'ajout de sodium cholate à des détergents permet de former des micelles mixtes de plus petite taille (Varade et *al.*, 2004).



**Figure 121 : Estimation de la taille de la couronne de détergent associée à BmrA.**

Nous avons déterminé le rayon du complexe protéine-BmrA  $R_{tot}$  comme décrit dans la partie matériel et méthodes. le serveur OPM nous a permis d'orienter BmrA au sein de la membrane et de déterminer l'épaisseur de celle-ci. En assimilant le complexe BmrA-détergent à une couronne circulaire, nous avons pu en déduire le rayon de la ceinture associée à BmrA pour chaque détergent.  $r_{tot} = r_{BmrA} + r_{ceint.}$  avec  $r_{BmrA} \approx 20$  Å.

## C. DISCUSSION ET CONCLUSION

Connaître la concentration réelle de détergent présent lorsqu'on extrait, purifie ou cristallise une protéine membranaire est une information clé. Notre méthode de dosage, basée sur la spectrométrie de masse de type MALDI permet de facilement répondre à cette information. Elle est rapide et simple à mettre en œuvre puisqu'elle nécessite seulement l'ajout du détergent dans sa version deutérée ou d'un étalon structuralement proche. Cette technique permet de doser potentiellement tous les détergents, à toutes les étapes de purification des protéines membranaires.

Le niveau de détection de chaque détergent varie en fonction de sa nature. Le DDM et la FC12 peuvent être mesurés précisément dans la solution jusqu'à 0,0002% (largement en dessous de leur concentration micellaire critique) et ces deux détergents peuvent encore être détectés après des dilutions respectivement 10 et 100X. Ces seuils de détection étant très bas, nous avons pu suivre l'évolution de la concentration du détergent lors d'une étape de dialyse. Connaître la quantité résiduelle de détergent est particulièrement utile lorsque l'on souhaite reconstituer une protéine membranaire en liposomes pour des études fonctionnelles. Un excès de détergent peut en effet entraver l'activité des protéines.

La spectrométrie de masse de type MALDI est l'une des seules méthodes qui permette de doser deux détergents lorsqu'ils sont mélangés. Nous avons pu quantifier le DDM et le  $\beta$ -OG en mélange et déterminer la composition des complexes BmrA- et mP-g-DDM-sodium cholate.

Le suivi à chaque étape chromatographique de la quantité de détergent associé à différentes protéines membranaires nous a permis d'apprendre de nouvelles informations sur le comportement de ces complexes en solution: **(1)** La première est que la quantité de détergent lié aux protéines membranaires varie de manière importante en fonction de la taille de leur surface hydrophobe et du type de détergent qui est utilisé. Bien que ce résultat puisse paraître prévisible, il n'avait jusqu'à présent jamais été montré dans la littérature. **(2)** La purification de BmrA en FC12, DDM et LMNG sur colonne d'affinité au nickel et gel filtration révèle que la quantité de chacun de ces détergents associée à la protéine reste constante au cours de ces étapes chromatographiques. Environ 400 molécules de DDM sont associées au dimère de BmrA, 160 pour le LMNG et 500 pour la FC12. Ceci suggère que les protéines membranaires ont besoin pour couvrir leur région hydrophobe d'une quantité minimale et suffisante de détergent qui ne varie pas au cours du processus de purification. **(3)** De manière surprenante, nous constatons en présence de protéine l'accumulation des micelles libres de FC12 et DDM dans les concentrateurs possédant un seuil de coupure de 50 kDa. Nous emmettons l'hypothèse que ce phénomène correspond à l'effet antithixotropique (Mewis et al., 1979) qui caractérise la propriété qu'ont certains fluides non newtonien de voir leur viscosité augmenter lorsqu'ils sont soumis à un gradient de vitesse constant. Etant donné que cet effet est dépendant de la force exercée sur la solution, nous cherchons actuellement à montrer que la réduction de la force de centrifugation permet d'accumuler moins de détergent. Si tel est le cas, il s'agirait d'une nouvelle propriété des détergents qui

pourrait faciliter la cristallisation et l'étude structurale des protéines membranaires. **(4)** L'ajout de sodium cholate à la purification de BmrA permet de réduire d'environ 7 Å la taille de la couronne de détergent associée à la protéine par rapport à celle obtenue en présence de DDM seul. Ce résultat démontre pourquoi les micelles mixtes de DDM-sodium cholate favorisent la cristallisation de BmrA. **(5)** Enfin, nous constatons que le nombre de molécules de DDM associées aux trois transporteurs ABC étudiés (mP-gp, BmrA et BmrC/D) est globalement identique. Le fait que ces protéines, qui appartiennent à la même famille, lient le même nombre de molécules de détergent suggère qu'elles partagent la même taille de surface hydrophobe. A partir de cette observation, on peut donc supposer que d'autres protéines possédant douze passages transmembranaires présenteront une quantité de détergent associée similaire. Cette hypothèse sera testée dans de prochains travaux.

La spectrométrie de masse de type MALDI est en passe de devenir la technique de référence pour doser avec précision et sensibilité la concentration de détergent libre et lié aux protéines membranaires. Cette méthode, à la fois simple et rapide, devrait grandement faciliter l'étude structurale et fonctionnelle des protéines membranaires en général.

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

# A

**Abramson J, Riistama S, Larsson G, Jasaitis A, Svensson-Ek M, Laakkonen L, Puustinen A, Iwata S, Wikström M.** *The structure of the ubiquinol oxidase from Escherichia coli and its ubiquinone binding site.* Nature Struct Biol (2000) 7:910-7.

**Adams JM, Cory S.** *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.* Science (1998) 281:1322-6

**Agarwal R, Kaye SB.** *Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy.* Nature reviews (2003) 3:502-16.

**Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J.** *Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments.* Nat Rev Microbiol (2010) 8:251-9.

**Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G.** *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding.* Science (2009) 323:1718-22.

**Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, Gerrard B, Baird L, Stauffer D, Peiffer A, Rattner A, Smallwood P, Li Y, Anderson KL, Lewis RA, Nathans J, Leppert M, Dean M, Lupski JR.** *A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy.* Nat Genet (1997) 15:236-46.

**Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M.** *A human placenta-specific ATP-binding cassette gen (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance.* Cancer Res (1998) 58:5337-9.

**Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM.** *Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A).* Hum Mol Genet (1999) 8:743-9.

**Ambudkar SV, Kim IW, Xia D, Sauna ZE.** *The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding.* FEBS Lett (2006) 580:1049-55.

**Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ.** *An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines.* Cancer Res (2000) 60:6101-10.

**André N, Cherouati N, Prual C, Steffan T, Zeder-Lutz G, Magnin T, Pattus F, Michel H, Wagner R, Reinhart C.** *Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in Pichia pastoris to levels required for structural studies via a single expression screen.* Protein Sci (2006) 15:1115-26.

**Arai T, Yasuda Y, Takaya T, Yoshimi N, Ito H, Fujiwara H.** *Correlation between the immunohistochemical and mRNA expression of glutathione S-transferase-pi and cisplatin plus etoposide chemotherapy response in patients with untreated primary non-small cell lung cancer.* Int J Oncol (1997) 11:127-31.

**Arechaga I, Miroux B, Karrasch S, Huijbregts R, de Kruijff B, Runswick MJ, Walker JE.** *Characterisation of new intracellular membranes in Escherichia coli accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(0) ATP synthase.* FEBS Lett (2000) 482:215-9.

**Arinaminpathy Y, Khurana E, Engelman DM, Gerstein MB.** *Computational analysis of membrane proteins : the largest class of drug targets.* Drug Discov Today (2009) 14:1130-5.

**Atwell S, Brouillette CG, Connors K, Emtage S, Gheyi T, Guggino WB, Hendle J, Hunt JF, Lewis HA, Lu F, Protasevich II, Rodgers LA, Romero R, Wasserman SR, Weber PC, Wetmore D, Zhang FF, Zhao X.** *Structures of a minimal human CFTR first nucleotide-binding domain as a monomer, head-to-tail homodimer, and pathogenic mutant.* Protein Eng Des Sel (2010) 23:375-84.

## B

**Bakos E, Evers R, Calenda G, Tusnady GE, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B.** *Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1).* J Cell Sci (2000) 24:4451-61.

**Bai J, Swartz DJ, Protasevich II, Brouillette CG, Harrell PM, Hildebrandt E, Gasser B, Mattanovich D, Ward A, Chang G, Urbatsch IL.** *A gene optimization strategy that enhances production of fully functional P-glycoprotein in Pichia pastoris.* PLoS One (2011) 6:e22577.

**Basso C, Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC.** *Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH2-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating.* J Gen Physiol (2003) 122:333-48.

**Barret LA, Polidori A, Bonneté F, Bernard-Savary P, Jungas C.** *A new high-performance thin layer chromatography-based assay of detergents and surfactants commonly used in membrane protein studies.* J Chromatogr A (2013) 1281:135-41.

**Barriere SL.** *Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance.* Expert Opin Pharmacother (2014) 6:1-3.

**Bauer BE, Wolfger H, Kuchler K.** *Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance.* Biochim Biophys Acta (1999) 1461:217-36.

**Bavro VN, Pietras Z, Fumham N, Perez-Cano L, Fernandez-Recio J, Pei XJ, Misra R, Luisi B.** *Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine.* Mol Cell (2008) 30:114-21.

**Bbosa GS, Mwebaza N, Odda J, Kyegombe DB, Ntale M.** *Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance.* Health (2014) 5:410-425.

**Benaroudj N, Saul F, Bellalou J, Miras I, Weber P, Bondet V, Murray GL, Adler B, Ristow P, Louvel H, Haouz A, Picardeau M.** *Structural and functional characterization of an orphan ATP-binding cassette ATPase involved in manganese utilization and tolerance in Leptospira spp.* J Bacteriol (2013) 195:5583-91.

**Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH.** *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters.* Science (2000) 290:1771-5.

**Berger W, Spiegl-Kreinecker S, Buchroithner J, Elbling L, Pirker C, Fischer J, Micksche M.** *Overexpression of the human major vault protein in astrocytic brain tumor cells.* Int J Cancer (2001) 94:377-82.



**Biedler JL, H Riehm.** *Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies.* Cancer Res (1970) 30:1174-84.

**Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B.** *ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains.* FEBS Lett (2006) 580:1023-35.

**Bill RM, Henderson PJ, Iwata S, Kunji ER, Michel H, Neutze R, Newstead S, Poolman B, Tate CG, Vogel H.** *Overcoming barriers to membrane protein structure determination.* Nat Biotechnol (2011) 29:335-40.

**Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y.** *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.* Science (1997) 277:1453-62.

**Böhm S, Licht A, Wuttge S, Schneider E, Bordignon E.** *Conformational plasticity of the type I maltose ABC transporter.* Proc Natl Acad Sci USA (2013) 110:5492-7.

**Bordignon E, Grote M, Schneider E.** *The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21<sup>st</sup> century towards a structural dynamic perspective on its mode of action.* Mol Microbiol (2010) 77:1354-66.

**Borges-Walmsley MI, McKeegan KS, Walmsley AR.** *Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs.* Biochem J (2003) 376:313-38.

**Broutin I, Benabdelhak H, Moreel X, Lascombe MB, Lerouge D, Ducruix A.** *Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of the outer membrane efflux proteins OprM and OprN from Pseudomonas aeruginosa.* Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun (2005) 61:315-8.

**Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA.** *The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters.* Molecular microbiology (1999) 31:394-395.

**Buchaklian AH, Funk AL, Klug CS.** *Resting state conformation of the MsbA homodimer as studied by site-directed spin labeling.* Biochemistry (2004) 43:8600-6.

**Bush K.** *Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections.* Crit care (2010) 14:224.

## C

**Cadieux N, Bradbeer C, Reeger-Schneider E, Koster W, Mohanty AK, Wiener MC, Kadner RJ.** *Identification of the periplasmic-binding protein BtuF of Escherichia coli.* J Bacteriol (2002) 184:706-17.

**Carlet J.** *Antibiotic resistance: Protecting antibiotics – the declaration of the world alliance against antibiotic resistance.* Indian J Crit Care Med (2014) 18:643-5.

**Castells M, Thibault B, Delord JP, Couderc B.** *Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death.* International journal of molecular sciences (2012) 13:9545-71.

**Cattoir V.** *Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria.* Pathol Biol (2004) 52:607-616.

**Chae PS, Rasmussen SG, Rana RR, Gotfryd K, Chandra R, Goren MA, Kruse AC, Nurva S, Lolland CJ, Pierre Y, Drew D, Popot JL, Picot D, Fox BG, Guan L, Gether U, Byrne B, Kobilka B,**

**Gellman SH.** *Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins.* Nat Methods (2010) 7:1003-8.

**Chami M, Steinfels E, Orelle C, Jault JM, Di Pietro A, Rigaud JL, Marco S.** *Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from Bacillus subtilis.* J Mol Biol (2002) 315:1075-85.

**Champeil P, Le Maire M, Moller JV, Riollot S, Guillain F, Green NM.** *Does intrinsic fluorescence reflect conformational changes in the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum.* FEBS Lett (1986) 206:93-8.

**Chang G, Roth CB.** *Structure of MsbA from E. coli : a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters.* Science (2001) 293:1793-800.

**Chang G.** *Structure of MsbA from Vibrio cholera: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation.* J Mol Biol (2003) 330:419-30.

**Chaptal V, Magnard S, Gueguen-Chaignon V, Falson P, Di Pietro A, Baubichon-Cortay H.** *Nucleotide-free crystal structure of nucleotide-binding domain 1 from human ABCC1 supports a general-base catalysis mechanism for ATP hydrolysis.* Biochem Pharmacol (2014) 3:6.

**Chapuy B, Koch R, Radunski U, Corsham S, Cheong N, Inagaki N, Ban N, Wenzel D, Reinhardt D, Zapf A, Schweyer S, Kosari F, Klapper W, Truemper L, Wulf GG.** *Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration.* Leukemia (2008) 22:1576-86.

**Chen J.** *Molecular mechanism of the Escherichia coli maltose transporter.* Curr Opin Struct Biol (2013) 23:492-8.

**Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB.** *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdrl (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells.* Cell (1986) 47:381-9.

**Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quirocho FA.** *A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle.* Mol Cell (2003) 12:651-61.

**Chen YJ, Pornillos O, Lieu S, Ma C, Chen AP, Chang G.** *X-ray structure of EmrE supports dual topology model.* Proc Natl Acad Sci USA (2007) 104:18999-9004.

**Chen ZP, Malapetsa A, Monks A, Myers TG, Mohr G, Sausville EA, Scudiero DA, Panasci LC.** *Nucleotide excision repair protein levels vis-à-vis anticancer drug resistance in 60 human tumor cell lines.* Ai Zheng (2002) 21:233-39.

**Chen S, Oldham ML, Davidson AL, Chen J.** *Carbon catabolite repression of the maltose transporter revealed by X-ray crystallography.* Nature (2013) 499:364-8.

**Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE.** *Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel.* Cell (1991) 66:1027-36.

**Chloupková M, LeBard LS, Koeller DM.** *MDL1 is a high copy suppressor of ATM1 : evidence for a role in resistance to oxidative stress.* J Mol Biol (2003) 331:155-65.

**Choudhury HG, Tong Z, Mathavan I, Li Y, Iwata S, Zirah S, Rebuffat S, van Veen HW, Beis K.** *Structure of an antibacterial peptide ATP-binding cassette transporter in a novel outward occluded state.* Proc Natl Acad Sci USA (2014) 111:9145-50.

**Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG.** *Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.* Science (1992) 258:1650-4.

**Coleman JA, Quazi F, Molday RS.** *Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport.* Biochim Biophys Acta (2013) 1831:555-74.

**Collins B, Stevens RC, Page R.** *Crystallization optimum solubility screening : using crystallization results to identify the optimal buffer for protein crystal formation.* Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun (2005) 61:1035-8.

**Colombo F, Baldan F, Mazzucchelli S, Martin-Padura I, Marighetti P, Cattaneo A, Foglieni B, Spreafico M, Gueneri S, Baccarin M, Bertolini F, Rossi G, Mazzaferro V, Cadamuro M, Maggioni M, Agnelli L, Rebulla P, Prati D, Porretti L.** *Evidence of distinct tumour-propagating cell populations with different properties in primary human hepatocellular carcinoma.* PLoS One (2011) 6:e21369.

**Cooper RS, Altenberg GA.** *Association/dissociation of the nucleotide-binding domains of the ATP-binding cassette protein MsbA measured during continuous hydrolysis.* J Biol Chem (2013) 288:20785-96.

**Crommentuyn KM, Schellens JH, van den Berg JD, Beijnen JH.** *In-vitro metabolism of anti-cancer drugs, methods and applications: paclitaxel, docetaxel, tamoxifen and ifosfamide.* Cancer Treat Rev (1998) 24:345-66.

## D

**daCosta CJ, Baenziger JE.** *A rapid method for assessing lipid:protein and detergent:protein ratios in membrane-protein crystallization.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr (2003) 59:77-83.

**Dahout-Gonzalez C, Brandolin G, Pebay-Peyroula E.** *Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr (2003) 59:2353-5.

**Dalmas O, Do Cao MA, Lugo MR, Sharom FJ, Di Pietro A, Jault JM.** *Time-resolved fluorescence resonance energy transfer shows that the bacterial multidrug ABC half-transporter BmrA functions as a homodimer.* Biochemistry (2005) 44:4312-21.

**Dano K.** *Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells.* Biochim Biophys Acta (1973) 323:466-83.

**Dassa E, Bouige P.** *The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms.* Res Microbiol (2001) 152:211-29.

**Davidson AL, Shuman HA, Nikaido H.** *Mechanism of maltose transport in Escherichia coli : transmembrane signaling by periplasmic binding proteins.* Proc Natl Acad Sci USA (1992) 89:2360-4.

**Davidson AL, Sharma S.** *Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in Escherichia coli.* J Bacteriol (1997) 179:5458-64.

**Davies DR, Hol WG.** *The power of vanadate in crystallographic investigations of phosphoryl transfer enzymes.* FEBS Lett (2004) 577:315-21.

- Dawson RJ, Locher KP.** *Structure of a bacterial multidrug ABC transporter.* Nature (2006) 443:180-5.
- Dawson RJ, Locher KP.** *Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from Staphylococcus aureus in complex with AMP-PNP.* FEBS Lett. (2007) 581:935-8.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G.** *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.* J Lipid Res (2001) 42:1007-17.
- De la Salle H, Zimmer J, Fricker D, Angenieux C, Cazenave JP, Okubo M, Maeda H, Plebani A, Tongio MM, Dormoy A, Hanau D.** *HLA Class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1.* J Clin Invest (1999) 103:9-13.
- Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, Michel H.** *Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of Rhodospseudomonas viridis at 3 Å resolution.* Nature (1985) 318:618-24.
- Deng G, Chow D, Sanyal G.** *Quantitative determination of saccharide surfactants in protein samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry.* Anal Biochem (2001) 289:124-9.
- Deshpande RA, Williams GJ, Limbo O, Williams RS, Kuhnlein J, Lee JH, Classen S, Guenther G, Russell P, Tainer JA, Paull TT.** *ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling.* EMBO J (2014) 33:482-500.
- De Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink RP, Hadchouel M.** *Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis.* Proc Natl Acad Sci USA (1998) 95:282-7.
- Dhaini HR, Thomas DG, Giordano TJ, Johnson TD, Biermann JS, Leu K, Hollenberg PF, Baker LH.** *Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma.* J Clin Oncol (2003) 21:2481-5.
- Dicker AP, Volkenandt M, Schweitzer BI, Banerjee D, Bertino JR.** *Identification and characterization of a mutation in the dihydrofolate reductase gene from methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line Pro-3 methotrexate RIII.* J Biol Chem (1990) 265:8317-21.
- Diederichs K, Diez J, Greller G, Muller C, Breed J, Schnell C, Vornrhein C, Boose W, Welte W.** *Crystal structure of Malk, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon Thermococcus litoralis.* EMBO J (2000) 19:5951-61.
- Di Mitri D, Toso A, Chen JJ, Sarti M, Pinton S, Jost TR, D'Antuono R, Montani E, Garcia-Escudero R, Guccini I, Da Silva-Alvarez S, Collado M, Eisenberger M, Zhang Z, Catapano C, Grassi F, Alimonti A.** *Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer.* Nature (2014) 515:134-7.
- Doerrler WT, Raetz CR.** *ATPase activity of the MsbA lipid flippase of Escherichia coli.* J Biol Chem (2002) 277:36697-705.
- Doshi R, Woebking B, van Veen HW.** *Dissection of the conformational cycle of the multidrug/lipid A ABC exporter MsbA.* Proteins (2010) 78:2867-72.
- Doshi R, van Veen HW.** *Substrate binding stabilizes a pre-translocation intermediate in the ATP-binding cassette transport protein MsbA.* J Biol Chem (2013) 288:21638-47.

**Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD.** *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.* Proc Natl Acad Sci USA (1998) 95:15665-70.

**Drew D, Klepsch MM, Newstead S, Flaig R, De Gier JW, Iwata S, Beis K.** *The structure of the efflux pump AcrB in complex with bile acid.* Mol Membr Biol (2008) 25:677-82.

**Drlica K, Zhao X.** *DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones.* Microbiol Mol Biol Rev (1997) 61:377-92.

**Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, Venter H, Chiu W, Luisi BF.** *Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump.* Nature (2014) 509:512-5.

## E

**Eicher T, Cha HJ, Seeger MA, Brandstatter L, El-Delik J, Bohnert JA, Kern WV, Verrey F, Grutter MG, Diederichs K, Pos KM.** *Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop.* Proc Natl Acad Sci USA (2012) 109:5687-92.

**Eriks LR, Mayor JA, Kaplan RS.** *A strategy for identification and quantification of detergents frequently used in the purification of membrane proteins.* Anal Biochem (2003) 323:234-41.

## F

**Faham S, Bowie JU.** *Bicelle crystallization : a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure.* J Mol Biol (2002) 316:1-6.

**Fang J, Wei Y.** *Expression, purification and characterization of the Escherichia coli membrane protein YajC.* Protein Pept Lett (2011) 18:601-8.

**Feng W, Benz FW, Cai J, Pierce WM, Kang YJ.** *Metallothionein disulfides are present in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart and increase under conditions of oxidative stress.* The journal of biological chemistry (2006) 281:681-7.

**Ferreira-Pereira A, Marco S, Decottignies A, Nader J, Goffeau A, Rigaud JL.** *Three-dimensional reconstruction of the Saccharomyces cerevisiae multidrug resistance protein Pdr5p.* J Biol Chem (2003) 278:11995-9.

**Fribourg PF, Chami M, Sorzano CO, Gubellini F, Marabini R, Marco S, Jault JM, Lévy D.** *3D cryo-electron reconstruction of BmrA, a bacterial multidrug ABC transporter in an inward-facing conformation and in a lipidic environment.* J Mol Biol (2014) 426:2059-69.

## G

**Galián C, Manon F, Dezi M, Torres C, Ebel C, Lévy D, Jault JM.** *Optimized purification of a heterodimeric ABC transporter in a highly stable form amenable to 2-D crystallization.* PLoS One (2011) 6:e19677.

**Garrett TA, Raetz CR, Richardson T, Kordestani R, Son JD, Rose RL.** *Identification of phosphatidylserylglutamate : a novel minor lipid in Escherichia coli.* J Lipid Res (2009) 50:1589-99.

**Garrod LP.** *Alexander Fleming . A dedication on the 50<sup>th</sup> anniversary of the discovery of penicillin.* Br J Exp Pathol (1979) 60:1-13.



**Gartner J, Moser H, Valle D.** *Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome.* Nat Genet (1992) 1:16-23.

**Gaudet R, Wiley DC.** *Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing .* EMBO J (2001) 20:4964-72.

**Geourjon C, Orelle C, Steinfels E, Blanchet C, Deléage G, Di Pietro A, Jault JM.** *A common mechanism for ATP hydrolysis in ABC transporter and helicase superfamilies.* Trends Biochem Sci (2001) 26:539-44.

**Gerber S, Comellas-Bigler M, Goetz BA, Locher KP.** *Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter.* Science (2008) 321:246-50.

**Gillet JP, Gottesman MM.** *Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1.* Drug Resist Updat (2012) 15:2-4.

**Goetz BA, Perozo E, Locher KP.** *Distinct gate conformations of the ABC transporter BtuCD revealed by electron spin resonance spectroscopy and chemical cross-linking.* FEBS Lett (2009) 583:266-70.

**Gong Y, Duvvuri M, Krise JP.** *Separate roles for the golgi apparatus and lysosomes in the sequestration of drugs in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60.* J Biol Chem (2003) 278:50234-9.

**Gotink KJ, Broxterman HJ, Labots M, de Haas RR, Dekker H, Honeywell RJ, Rudek MA, Beerepoot LV, Musters RJ, Jansen G, Griffioen AW, Assaraf YG, Pili R, Peters GJ, Verheul HM.** *Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance.* Clin Cancer Res (2011) 17:7337-46.

**Gottesman MM, Ambudkar SV.** *Overview: ABC transporters and human disease.* J Bioenerg Biomembr (2001) 33:453-8.

**Gottesman MM, Pastan I.** *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.* Annu Rev Biochem (1993) 62:385-427.

**Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I.** *Genetic analysis of the multidrug transporter.* Annu Rev Genet (1995) 29:607-49.

**Gottesman MM, Ambudkar SV, Xia D.** *Structure of a multidrug transporter.* Nat Biotechnol. (2009) 27:546-7.

**Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, Kobilka BK.** *Structure of the  $\delta$ -opioid receptor bound to naltrindole.* Nature (2012) 485:400-4.

**Griffin L, Lawson A.** *Antibody fragments as tools in crystallography.* Clin Exp Immunol (2011) 165:285-91.

**Grossmann N, Vakkasoglu AS, Hulpke S, Abele R, Gaudet R, Tampé R.** *Mechanistic determinants of the directionality and energetics of active export by a heterodimeric ABC transporter.* Nat commun (2014) 5:5419.

## H

**Habel N, Hamidouche Z, Girault I, Patino-Garcia A, Lecanda F, Marie PJ, Fromigüé O.** *Zinc chelation: a metallothionein 2A's mechanism of action involved in osteosarcoma cell death and chemotherapy resistance.* Cell Death & Disease (2013) 4:e874.



- Haffke M, Menzel A, Carius Y, Jahn D, Heinz DW.** *Structures of the nucleotide-binding domain of the human ABCB6 transporter and its complexes with nucleotides.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr (2010) 66:979-87.
- Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T.** *Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist.* Nature (2012) 482:547-51.
- Han M, Lv Q, Tang XJ, Hu YL, Xu DH, Li FZ, Liang WQ, Gao JQ.** *Overcoming drug resistance of MCF-7/ADR cells by altering intracellular distribution of doxorubicin via MVP knockdown with a novel siRNA polyamidoamine-hyaluronic acid complex.* J Control Release (2012) 163:136-44.
- Hanekop N, Zaitseva J, Jenewein S, Holland IB, Schmitt L.** *Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB.* FEBS Lett (2006) 580:1036-41.
- Hattori M, Hibbs RE, Gouaux E.** *A fluorescence-detection size-exclusion chromatography-based thermostability assay for membrane protein precrystallization screening.* Structure (2012) 20:1293-9.
- He X, Szewczyk P, Evin M, Hong WX, Zhang Q, Chang G.** *Structure of a cation-bound multi-drug and toxic compound extrusion transporter.* Nature (2010) 467:991-4.
- Heath E, Howarth OW.** *Vanadium-51 and oxygen-17 nuclear magnetic resonance study of vanadate equilibria and kinetics.* J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1981) 1105-1110.
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA.** *The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport protein introduction.* Pflugers Arch (2004) 447:465-8.
- Heras B, Edeling MA, Byriel KA, Jones A, Raina S, Martin JL.** *Dehydration converts DsbG crystal diffraction from low to high resolution.* Structure (2003) 11:139-45.
- Higgins CF, Gottesman MM.** *Is the multidrug transporter a flippase ?.* Trends Biochem (1992) 17:18-21.
- Higgins CF, Linton KJ.** *The ATP switch model for ABC transporters.* Nat Struct Mol Biol (2004) 11:918-26.
- Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW.** *A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria.* Nature (1986) 323:448-50.
- Higgins CF.** *ABC transporters: from microorganisms to man.* Annu Rev Cell Biol (1992) 8:67-113.
- Higgins MK, Eswaran J, Edwards P, Schertler GF, Hughes C, Koronakis V.** *Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC.* J Mol Biol (2004) 342:697-702.
- Hinoshita E, Uchiumi T, Taquchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, Sugimachi K, Kuwano M.** *Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multi-drug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas.* Clin Cancer Res (2000) 6:2401-7.

**Hofmeister F.** *Zur Lehre von der Wirkung der Salze.* Arch Exp Pathol Pharmacol (1888) 24 : 247-260.

**Hohl M, Briand C, Grutter MG, Seeger MA.** *Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation.* Nat Struct Mol Biol (2012) 19:395-402.

**Hohl M, Hurlimann LM, Bhom S, Schoppe J, Grutter MG, Bordignon E, Seeger MA.** *Structural basis for allosteric cross-talk between the asymmetric nucleotide binding sites of a heterodimeric ABC exporter.* Proc Natl Acad Sci USA (2014) 111:11025-30.

**Hollenstein K, Frei DC, Locher KP.** *Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein.* Nature (2007) 446:213-6.

**Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA.** *Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily.* Cell (2000) 101:789-800.

**Hopfner KP, Tainer JA.** *Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures.* Curr Opin Struct Biol (2003) 13:249-55.

**Hou Y, Cui L, Riordan JR, Chang X.** *Allosteric interactions between the two non-equivalent nucleotide binding domains of multidrug resistance protein MRP1.* J Biol Chem (2000) 275: 20280-7.

**Hubbell WL, Altenbach C, Hubbell CM, Khorana HG.** *Rhodopsin structure, dynamics and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking.* Adv Protein Chem (2003) 63:243-90.

**Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH.** *Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter.* Nature (1998) 396:703-7.

**Hung LW, Kim HB, Murakami S, Gupta G, Kim CY, Terwilliger TC.** *Crystal structure of AcrB complexed with linezolid at 3.5 Å resolution.* J Struct Funct Genomics (2013) 14:71-5.

**Hunte C, Koepke J, Lange C, Rossmannith T, Michel H.** *Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment.* Structure (2000) 8:669-84.

**Hvorup RN, Goetz BA, Niederer M, Hollenstein K, Perozo E, Locher KP.** *Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF.* Science (2007) 317:1387-90.

## I

**Ifergan I, Scheffer GL, Assaraf YG.** *Novel extracellular vesicles mediate an ABCG2-dependent anticancer drug sequestration and resistance.* Cancer Res (2005) 65:10952-8.

**Ishii S, Yano T, Okamoto A, Murakawa T, Hayashi H.** *Boundary of the nucleotide-binding domain of *Streptococcus* ComA based on functional and structural analysis.* Biochemistry (2013) 52:2545-55.

**Izquierdo MA, Scheffer GL, Schroeijers AB, de Jong MC, Scheper RJ.** *Vault-related resistance to anticancer drugs determined by the expression of the major vault protein LRP.* Cytotechnology (1998) 27:137-48.

## J

**Jacso T, Schneider E, Rupp B, Reif B.** *Substrate transport activation is mediated through second periplasmic loop of transmembrane protein MalF in maltose transport complex of Escherichia coli.* J Biol Chem (2012) 287:17040-9.

**Janas E, Hofacker M, Chen M, Gompf S, van der Does C, Tampé R.** *The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1P.* J Biol Chem (2003) 278:26862-9.

**Januchowski R, Zawierucha P, Andrzejewska M, Rucinski M, Zabel M.** *Microarray-based detection and expression analysis of ABC and SLC transporters in drug-resistant ovarian cancer cell lines.* Biomed Pharmacother (2013) 67:240-5.

**Januchowski R, Zawierucha P, Rucinski M, Andrzejewska M, Wojtowicz K, Nowicki M, Zabel M.** *Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line.* Biomed Pharmacother (2014) 68:447-53.

**Jardetzky O.** *Simple allosteric model for membrane pumps.* Nature (1966) 211:969-70.

**Jeffrey PD.** *Analysis of errors in the structure determination of MsbA.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2009) 65:193-9.

**Jin MS, Oldham ML, Zhang Q, Chen J.** *Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from Caenorhabditis elegans.* Nature (2012) 490:566-9.

**Johnson E, Nguyen PT, Yeates TO, Rees DC.** *Inward facing conformations of the MetNI methionine ABC transporter: implications for the mechanism of transinhibition.* Protein Sci. (2012) 21:84-96.

**Jones PM, George AM.** *Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit.* Proc Natl Acad Sci (2002) 99:12639-44.

**Jones PM, George AM.** *The ABC transporter structure and mechanism : perspectives on recent research.* Cell Mol Life Sci (2004) 61:682-99.

**Jones PM, George AM.** *Opening of the ADP-bound active site in the ABC transporter ATPase dimer : evidence for a constant contact, alternating sites model for the catalytic cycle.* Proteins (2009) 75:387-96.

**Jones PM, George AM.** *Role of the D-loops in allosteric control of ATP hydrolysis in an ABC transporter.* J Phys Chem A (2012) 116:3004-13.

**Jones PM, George AM.** *Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record.* Crit Rev Biochem Mol Biol (2013) 48:39-50.

**Jones PM, George AM.** *A reciprocating twin-channel model for ABC transporters.* Q Rev Biophys (2014) 47:189-220.

**Joseph B, Jeschke G, Goetz BA, Locher KP, Bordignon E.** *Transmembrane gate movements in the type II ATP-binding cassette (ABC) importer BtuCD-F during nucleotide cycle.* J Biol Chem (2011) 286:41008-17.

**Juliano RL, Ling V.** *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.* Biochim Biophys Acta (1976) 455:152-62.

# K

**Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA.** *Mechanisms of fluoroquinolone resistance in Staphylococcus aureus.* J Infect Dis (1991) 163:1080-6.

**Kadaba NS, Kaiser JT, Johnson E, Lee A, Rees DC.** *The high-affinity E. coli methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation.* Science (2008) 321:250-3.

**Kadner RJ.** *Transport and utilization of D-methionine and other methionine sources in Escherichia coli.* J Bacteriol (1977) 129:207-16.

**Kang HJ, Lee C, Drew D.** *Breaking the barriers in membrane protein crystallography.* Int J Biochem Cell Biol (2013) 45:636-44.

**Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretzschmar T, Lee Y, Martinoia E.** *Plant ABC Transporters.* Arabidopsis Book (2011) 9:e0153.

**Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ, Hunt JF.** *Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter.* Structure (2001) 9:571-86.

**Karpowich NK, Huang HH, Smith PC, Hunt JF.** *Crystal structures of the BtuF periplasmic-binding protein for vitamin B12 suggest a functionally important reduction in protein mobility upon ligand binding.* J Biol Chem (2003) 278:8429-34.

**Kaufmann TC, Engel A, Rémy HW.** *A novel method for detergent concentration determination.* Biophys J (2006) 90:310-7.

**Kaur P.** *Expression and characterization of DrrA and DrrB proteins of Streptomyces peucetius in Escherichia coli: DrrA is an ATP binding protein.* J Bacteriol (1997) 179:569-75.

**Kaur P, Russell J.** *Biochemical coupling between the DrrA and DrrB proteins of the doxorubicin efflux pump of Streptomyces peucetius.* J Biol Chem (1998) 273:17933-9.

**Kavallaris M, Tait AS, Walsh BJ, He L, Horwitz SB, Norris MD, Haber M.** *Multiple microtubule alterations are associated with vinca alkaloid resistance in human leukemia cells.* Cancer Res (2001) 61:5803-9.

**Kefala G, Ahn C, Krupa M, Esquivies L, Maslennikov I, Kwiatkowski W, Choe S.** *Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12.* Protein Sci (2010) 19:1117-25.

**Kerr ID.** *Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains.* Biochim Biophys Acta (2002) 1561:47-64.

**Khare D, Oldham ML, Orelle C, Davidson AL, Chen J.** *Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations.* Mol Cell (2009) 33:528-36.

**Kim S, Jeon TJ, Oberai A, Yang D, Schmidt JJ, Bowie JU.** *Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins.* Proc Natl Acad Sci USA (2005) 102:14278-83.

**Kispal G, Csere P, Guiard B, Lill R.** *The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis.* FEBS Lett (1997) 418:346-50.

**Klein I, Sarkadi B, Varadi A.** *An inventory of the human ABC proteins.* Biochim Biophys Acta (1999) 1461:237-62.

**Kodan A, Yamaguchi T, Nakatsu T, Sakiyama K, Hipolito CJ, Fujioka A, Hirokane R, Ikeguchi K, Watanabe B, Hiratake J, Kimura Y, Suga H, Ueda K, Kato H.** *Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog.* Proc Natl Acad Sci (2014) 111:4049-54.

**Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, Yang XL, Gao H, Miura N, Sugiyama T, Akiyama S.** *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance.* Cancer Res (2000) 60:1312-6.

**Korkhov VM, Mireku SA, Locher KP.** *Structure of AMP-PNP-bound vitamin B<sub>12</sub> transporter BtuCD-F.* Nature (2012) 490:367-72.

**Korkhov VM, Mireku SA, Hvorup RN, Locher KP.** *Asymmetric states of vitamin B12 transporter BtuCD are not discriminated by its cognate substrate binding protein BtuF.* FEBS Lett (2012) 586:972-6.

**Korkhov VM, Mireku SA, Veprintsev DB, Locher KP.** *Structure of AMP-PNP-bound BtuCD and mechanism of ATP-powered vitamin B12 transport by BtuCD-F.* Nat Struct Mol Biol. (2014) 21:1097-9.

**Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C.** *Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export.* Nature (2000) 405:914-9.

**Koshy C, Schweikhard ES, Gärtner RM, Perez C, Yildiz O, Ziegler C.** *Structural evidence for functional lipid interactions in the betaine transporter BetP.* EMBO J (2013) 32:3096-105.

**Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL.** *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.* J Mol Biol (2001) 305:567-80.

**Kuga T, Sakamaki S, Matsunaga T, Hirayama Y, Kuroda H, Takahashi Y, Kusakabe T, Kato I, Niitsu Y.** *Fibronectin fragment –facilitated retroviral transfer of the glutathione-S-transferase  $\pi$  gene into CD34<sup>+</sup> cells to protect them against alkylating agents.* Hum Gene Ther (1997) 8:1901-10.

**Kuhnke G, Neumann K, Mühlenhoff U, Lill R.** *Stimulation of the ATPase activity of the yeast mitochondrial ABC transporter Atm1p by thiol compounds.* Mol Membr Biol (2006) 23:173-84.

**Kunst F et al.** *The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium Bacillus subtilis.* Nature (1997) 390:249-56.

**Kuo A, Bowler MW, Zimmer J, Antcliff JF, Doyle DA.** *Increasing the diffraction limit and internal order of a membrane protein crystal by dehydration.* J Struct Biol (2003) 141:97-102.

## L

**Laemmli UK.** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature (1970) 227:680-5.

**Laganowsky A, Reading E, Allison TM, Ulmschneider MB, Degiacomi MT, Baldwin AJ, Robinson CV.** *Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function.* Nature (2014) 510:172-5.

**Lage H, Dietel M.** *Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance.* J Cancer Res Clin Oncol (1999) 125:156-165.



- Lage H, Helmbach H, Dietel M, Schadendorf D.** *Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance.* Br J Cancer (2000) 82:488-91.
- Lamers MH, Perrakis A, Enzlin JH, Winterwerp HH, de Wind N, Sixma TK.** *The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch.* Nature (2000) 407:711-7.
- Larsen AK, Escarqueil AE, Skladanowski A.** *Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents.* Pharmacol Ther (2000) 85:217-29.
- Law CJ, Maloney PC, Wang DN.** *Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters.* Annu Rev Microbiol (2008) 62:289-305.
- Le Maire M, Kwee S, Andersen JP, Møller JV.** *Mode of interaction of polyoxyethyleneglycol detergents with membrane proteins.* Eur J Biochem (1983) 129:525-32.
- Lee K, Klein-Szanto AJ, Kruh GD.** *Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells.* J Natl Cancer Inst (2000) 92:1934-40.
- Lee JY, Urbatsch IL, Senior AE, Wilkens S.** *Projection structure of P-glycoprotein by electron microscopy. Evidence for a closed conformation of the nucleotide binding domains.* J Biol Chem (2002) 277:40125-31.
- Lee JY, Yang JG, Zhitnitsky D, Lewinson O, Rees DC.** *Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter.* Science (2014) 343:1133-6.
- Lee SC, Bennett BC, Hong WX, Fu Y, Baker KA, Marcoux J, Robinson CV, Ward AB, Halpert JR, Stevens RC, Stout CD, Yeager MJ, Zhang Q.** *Steroid-based facial amphiphiles for stabilization and crystallization of membrane proteins.* Proc Natl Acad Sci USA (2013) 110:1203-11.
- Lemieux MJ, Song J, Kim MJ, Huang Y, Villa A, Auer M, Li XD, Wang DN.** *Three-dimensional crystallization of the Escherichia coli glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily.* Protein Sci (2003) 12:2748-56.
- Levy SB, McMurry L.** *Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline.* Nature (1978) 276:90-2.
- Levy SB, Marshall B.** *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.* Nat Med (2004) 10:S122-9.
- Lewis HA, Zhao X, Wang C, Sauder JM, Rooney I, Noland BW, Lorimer D, Kearins MC, Connors K, Condon B, Maloney PC, Guggino WB, Hunt JF, Emtage S.** *Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure.* J Biol Chem (2005) 280:1346-53.
- Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, Hunt JF, Kearins MC, Lorimer D, Maloney PC, Post KW, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S, Thibodeau PH, Thomas PJ, Zhang M, Zhao X, Emtage S.** *Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.* EMBO J (2004) 23:282-93.
- Lewis HA, Wang C, Zhao X, Hamuro Y, Connors K, Kearins MC, Lu F, Sauder JM, Molnar KS, Coales SJ, Maloney PC, Guggino WB, Wetmore DR, Weber PC, Hunt JF.** *Structure and dynamics of NBD1 from CFTR characterized using crystallography and hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry.* J Mol Biol (2010) 396:406-30.



**Li Q, Shu Yan.** *Role of solute carriers in response to anticancer drugs.* Molecular and Cellular Therapies (2014) 2:15.

**Li XZ, Nikaido H.** *Efflux-mediated drug resistance in bacteria.* Drugs (2004) 64:159-204.

**Li Q, Yu JJ, Mu C, Yunmbam MK, Slavsky D, Cross CL, Bostick-Bruton F, Reed E.** *Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells.* Anticancer Res (2000) 20:645-652.

**Li X, Zhuo W, Yu J, Ge J, Gu J, Feng Y, Yang M, Wang L, Wang N.** *Structure of the nucleotide-binding domain of a dipeptide ABC transporter reveals a novel iron-sulfur cluster binding domain.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr (2013) 69:256-65.

**Li J, Jaimes KF, Aller SG.** *Refined structures of mouse P-glycoprotein.* Protein Sci. (2014) 23:34-46.

**Liesa M, Luptak I, Qin F, Hyde BB, Sahin E, Siwik DA, Zhu Z, Pimentel DR, Xu XJ, Ruderman NB, Huffman KD, Doctrow SR, Richey L, Colucci WS, Shirihai OS.** *Mitochondrial transporter ATP binding cassette mitochondrial erythroid is a novel gene required for cardiac recovery after ischemia /reperfusion.* Circulation (2011) 124:806-13.

**Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Mühlenhoff U.** *The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism.* Biochim Biophys Acta (2012) 1823:1491-508.

**Linton KJ, Higgins CF.** *Structure and function of ABC transporters : the ATP switch provides flexible control.* Pflugers Arch (2007) 453:555-67.

**Locher KP, Lee AT, Rees DC.** *The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism.* Science (2002) 296:1091-8.

**Locher KP.** *Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci (2009) 364:239-45.

**Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL.** *OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membrane.* Nucleic Acids Res (2012) 40:D370-6.

**Lomovskaya O, Lewis K.** *Emr, an Escherichia coli locus for multidrug resistance.* Proc Natl Acad Sci USA (1992) 89:8938-42.

**Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.** *Disulfide cross-linking analysis shows that transmembrane segments 5 and 8 of human P-glycoprotein are close together on the cytoplasmic side of the membrane.* J Biol Chem (2004) 279:7692-7.

**Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.** *Val133 and Cys137 in transmembrane segment 2 are close to Arg935 and Gly939 in transmembrane segment 11 of human P-glycoprotein.* J Biol Chem (2004) 279:18232-8.

**Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.** *Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket.* Biochem J (2006) 399:351-9.

**Loo TW, Clarke DM.** *Mutational analysis of ABC proteins.* Arch Biochem Biophys (2008) 476:51-64.

**Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.** *Identification of residues in the drug translocation pathway of the human multidrug resistance P-glycoprotein by arginine mutagenesis.* J Biol Chem (2009) 284:24074-87.

**Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM.** *Human P-glycoprotein is active when the two halves are clamped together in the closed conformation.* Biochem Biophys Res Commun. (2010) 395:436-40.

**Loo TW, Clarke DM.** *A salt bridge in intracellular loop 2 is essential for folding of human P-glycoprotein.* Biochemistry (2013) 52:3194-6.

**Loo TW, Clarke DM.** *Cysteines introduced into extracellular loops 1 and 4 of human P-glycoprotein that are close only in the open conformation spontaneously form a disulfide bond that inhibits drug efflux and ATPase activity.* J Biol Chem (2014) 289:24749-58.

**Lu G, Westbrook JM, Davidson AL, Chen J.** *ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation.* Proc Natl Acad Sci USA (2005) 102:17969-74.

**Lu M, Symersky J, Radchenko M, Koide A, Guo Y, Nie R, Koide S.** *Structures of a Na<sup>+</sup>-coupled, substrate-bound MATE multidrug transporter.* Proc Natl Acad Sci USA (2013) 110:2099-104.

## M

**Maguire A, Hellier K, Hammans S, May A.** *X-linked cerebellar ataxia and sideroblastic anaemia associated with a missense mutation in the ABC7 gene predicting V411L.* Br J Haematol (2001) 115:910-7.

**Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI, Kobilka BK, Granier S.** *Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist.* Nature (2012) 485:321-6.

**Matar-Merheb R, Rhimi M, Leydier A, Huché F, Galián C, Desuzinges-Mandon E, Ficheux D, Flot D, Aghajari N, Kahn R, Di Pietro A, Jault JM, Coleman AW, Falson P.** *Structuring detergents for extracting and stabilizing functional membrane proteins.* PLoS One (2011) 6:e18036.

**Matsumoto Y, Tamiya T, Nagao S.** *Resistance to topoisomerase II inhibitors in human glioma cell lines overexpressing multidrug resistant associated protein (MRP) 2.* J Med Invest (2005) 52:41-8.

**Mattle D, Zeltina A, Woo JS, Goetz BA, Locher KP.** *Two stacked heme molecules in the binding pocket of the periplasmic heme-binding protein HmuT from Yersinia pestis.* J Mol Biol (2010) 404:220-31.

**Mavaro A, Abts A, Bakkes PJ, Moll GN, Driessen AJ, Smits SH, Schmitt L.** *Substrate recognition and specificity of the NisB protein, the lantibiotic dehydratase involved in nisin biosynthesis.* J Biol Chem (2011) 286:30552-60.

**McMurry L, Petrucci RE, Levy SB.** *Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli.* Proc Natl Acad Sci USA (1980) 77:3974-7.

**McPherson A.** *Current approaches to macromolecular crystallization.* Eur J Biochem (1990) 189:1-23.

**McPherson A, Day J, Harris LJ.** *Crystals of the beta-subunit of bovine luteinizing hormone and indicators for the involvement of proteolysis in protein crystallization.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2004) 60:572-7.

**Mehmood S, Domene C, Forest E, Jault JM.** *Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations.* Proc Natl Acad Sci USA (2012) 109:10832-6.

**Mendoza JL, Schmidt A, Li Q, Nuvaga E, Barrett T, Bridges RJ, Feranchak AP, Brautigam CA, Thomas PJ.** *Requirements for efficient correction of  $\Delta F508$  CFTR revealed by analyses of evolved sequences.* Cell (2012) 148:164-74.

**Mikolosko J, Bobyk K, Zgurskaya HI, Ghosh P.** *Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA.* Structure (2006) 14:577-87.

**Miller G.** *Scientific publishing. A scientist's nightmare : software problem leads to five retractions.* Science (2006) 314:1856-7.

**Miroux B, Walker JE.** *Over-production of proteins in Escherichia coli : mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.* J Mol Biol (1996) 260:289-98.

**Mittal A, Bohm S, Grutter MG, Bordignon E, Seeger MA.** *Asymmetry in the homodimeric ABC transporter MsbA recognized by a DARPin.* J Biol Chem (2012) 287:20395-406.

**Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE.** *Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes.* Cancer Res (1999) 59:8-13.

**Moeller A, Lee SC, Tao H, Speir JA, Chang G, Urbatsch IL, Potter CS, Carragher B, Zhang Q.** *Distinct conformational spectrum of homologous multidrug ABC transporters.* Structure (2015) 23:450-60.

**Molina-Bolívar JA, Hierrezuelo JM, Carnero Ruiz C.** *Self-assembly, hydration, and structures in N-decanoyl-N-methylglucamide aqueous solutions : effect of salt addition and temperature.* J Colloid Interface Sci (2007) 313:656-64.

**Morita Y, Kodama K, Shiota S, Mine T, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T.** *NorM, a putative multidrug efflux protein, of Vibrio parahaemolyticus and its homolog in Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother (1998) 42:1778-82.

**Murakami S, Nakashima S, Yamashita E, Yamaguchi A.** *Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB.* Nature (2002) 419:587-93.

**Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi.** *Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism.* Nature (2006) 443:173-9.

**Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT.** *Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1.* Cancer Res (1997) 57:3026-31.

## N

**Nakanishi Y, Kawasaki M, Bai F, Takayama K, Pei XH, Takano K, Inoue K, Osaki S, Hara N, Kiyohara C.** *Expression of p53 and glutathione S-transferase-pi relates to clinical drug resistance in non-small cell lung cancer.* *Oncology* (1999) 57:318-23.

**Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A.** *Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket.* *Nature* (2011) 480:565-9.

**Nakayama K, Miyazaki K, Kanzaki A, Fukumoto M, Takebayashi Y.** *Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines.* *Oncol Rep* (2001) 8:1285-7.

**Newstead S, Kim H, von Heijne G, Iwata S, Drew D.** *High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae*.* *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) 104:13936-41.

**Newstead S, Hobbs J, Jordan D, Carpenter EP, Iwata S.** *Insights into outer membrane protein crystallization.* *Mol Membr Biol* (2008) 25:631-8.

**Newstead S, Fowler PW, Bilton P, Carpenter EP, Sadler PJ, Campopiano DJ, Sansom MS, Iwata S.** *Insights into how nucleotide-binding domains power ABC transport.* *Structure* (2009) 17:1213-22.

**Nikaido K, Ames GF.** *One intact ATP-binding subunit is sufficient to support ATP hydrolysis and translocation in an ABC transporter, the histidine permease.* *J Biol Chem* (1999) 274:26727-35.

**Nishino K, Yamaguchi A.** *Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*.* *J Bacteriol* (2001) 183:5803-5812.

**Nollert P, Qiu H, Caffrey M, Rosenbusch JP, Landau EM.** *Molecular mechanisms for the crystallization of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases.* *FEBS Lett* (2001) 504:179-86.

## O

**Obmolova G, Ban C, Hsieh P, Yang W.** *Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA.* *Nature* (2000) 407:703-10.

**Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE.** *Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids.* *Anti-microb Agents Chemother* (1999) 43:1085-90.

**Oldham ML, Khare D, Quiocho FA, Davidson AL, Chen J.** *Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter.* *Nature* (2007) 450:515-21.

**Oldham ML, Chen J.** *Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis.* *Proc Natl Acad Sci USA* (2011) 108:15152-6.

**Oldham ML, Chen S, Chen J.** *Structural basis for substrate specificity in the *Escherichia coli* maltose transport system.* *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110:18132-7.

**Orelle C, Dalmas O, Gros P, Di Pietro A, Jault JM.** *The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA.* *J Biol Chem* (2003) 278:47002-8.

**Orelle C, Ayvaz T, Everly RM, Klug CS, Davidson AL.** *Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter.* Proc Natl Acad Sci USA (2008) 105:12837-42.

**Orelle C, Alvarez FJ, Oldham ML, Orelle A, Wiley TE, Chen J, Davidson AL.** *Dynamics of  $\alpha$ -helical subdomain rotation in the intact maltose ATP-binding cassette transporter.* Proc Natl Acad Sci USA (2010) 107:20293-8.

**Ose T, Fujie T, Yao M, Watanabe N, Tanaka I.** *Crystal structure of the ATP-binding cassette of multisugar transporter from *Pyrococcus horikoshii* OT3.* Proteins (2004) 57:635-8.

**Ostermeier C, Iwata S, Ludwig B, Michel H.** *Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase.* Nat Struct Biol (1995) 2:842-6.

**Ostermeier C, Michel H.** *Crystallization of membrane proteins.* Curr Opin Struct Biol (1997) 7:697-701.

**Oswald C, Holland IB, Schmitt L.** *The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us ?* Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2006) 372:385-99.

**Oswald C, Jenewein S, Smits SH, Holland IB, Schmitt L.** *Water-mediated protein-fluorophore interactions modulate the affinity of an ABC-ATPase /TNP-ADP complex.* J Struct Biol (2008) 162:85-93.

## P

**Pan P, Li Y, Yu H, Sun H, Hou T.** *Molecular principle of topotecan resistance by topoisomerase I mutations through molecular modeling approaches.* J Chem Inf Model (2013) 53:997-1006.

**Parcej D, Tampé R.** *ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition.* Nat Chem Biol (2010) 6:572-80.

**Park S, Lim BB, Perez-Terzic C, Mer G, Terzic A.** *Interaction of asymmetric ABCC9-encoded nucleotide binding domains determines KATP channel SUR2A catalytic activity.* J Proteome Res. (2008) 7:1721-8.

**Passagne I, Evrard A, Depeille P, Cuq P, Cupissol D, Vian L.** *O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase e (MGMT) overexpression in melanoma cells induces resistance to nitrosoureas and temozolomide but sensitizes to mitomycin C.* Toxicol Appl Pharmacol (2006) 211:97-105.

**Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP.** *Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene.* Science (1996) 271:1126-8.

**Pei XY, Hinchliffe P, Symmons MF, Koronakis E, Benz R, Hughes C, Koronakis V.** *Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct.* Proc Natl Acad Sci USA (2011) 108:2112-7.

**Perria CL, Rajamanickam V, Lapinski PE, Raghavan M.** *Catalytic site modifications of TAP1 and TAP2 and their functional consequences.* J Biol Chem (2006) 281:39839-51.

**Piddock LJ.** *Multidrug-resistance efflux pumps –not just for resistance.* Nat Rev Microbiol (2006) 4:629-36.



**Pinkett HW, Lee AT, Lum P, Locher KP, Rees DC.** *An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter.* Science (2007) 315:373-7.

**Poole K.** *Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria.* Clin Microbiol Infect (2004) 10:12-26.

**Prince C, Jia Z.** *Measurement of detergent concentration using 2, 6-dimethylphenol in membrane-protein crystallization.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr (2012) 68:1694-6.

**Privé GG.** *Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins.* Methods (2007) 41:388-97.

**Procko E, Raghuraman G, Wiley DC, Raghavan M, Gaudet R.** *Identification of domain boundaries within the N-termini of TAP1 and TAP2 and their importance in tapasin binding and tapasin-mediated increase in peptide loading of MHC class I.* Immunol Cell Biol (2005) 83:475-82.

**Procko E, Ferrin-O'Connell I, Ng SL, Gaudet R.** *Distinct structural and functional properties of the ATPase sites in an asymmetric ABC transporter.* Mol Cell (2006) 24:51-62.

**Procko E, O'Mara ML, Bennett WF, Tieleman DP, Gaudet R.** *The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter.* FASEB J (2009) 23:1287-302.

**Psakis G, Polaczek J, Essen LO.** *AcrB et al.: Obstinate contaminants in a picogram scale. One more bottleneck in the membrane protein structure pipeline.* J Struct Biol (2009) 166:107-11.

**Putman M, van Veen HW, Konings WN.** *Molecular properties of bacterial multidrug transporters.* Microbiol Mol Biol Rev (2000) 64:672-693.

## Q

**Qiu H, Caffrey M.** *The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects.* Biomaterials (2000) 21:223-34.

**Qu Q, Sharom FJ.** *FRET analysis indicates that the two ATPase active sites of the P-glycoprotein multidrug transporter are closely associated.* Biochemistry (2001) 40:1413-22.

**Quazi F, Lenevich S, Molday RS.** *ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer.* Nat Commun (2012) 3:925.

**Quentin Y, Fichant G, Denizot F.** *Inventory, assembly and analysis of Bacillus subtilis ABC transport systems.* J Mol Biol (1999) 287:467-84.

**Quioco FA, Ledvina PS.** *Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes.* Mol Microbiol (1996) 20:17-25.

## R

**Rafii A, Mirshahi P, Poupot M, Faussat AM, Simon A, Ducros E, Mery E, Couderc B, Lis R, Capdet J, Bergalet J, Querleu D, Dragonnet F, Fournié JJ, Marie JP, Pujade-Lauraine E, Favre G, Soria J, Mirshahi M.** *Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours.* PLoS One (2008) 3:e3894.



**Raju TN.** *The Nobel Chronicles. 1945: Sir Alexander Fleming (1881-1955); Sir Ernst Boris Chain (1906-1979); and Baron Howard Walter Florey (1898-1968).* Lancet (1999) 353:936.

**Ramachandra M, Ambudkar SV, Chen D, Hrycyna CA, Dey S, Gottesman MM, Pastan I.** *Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state.* Biochemistry (1998) 37:5010-9.

**Ramaen O, Leulliot N, Sizun C, Ulryck N, Pamard O, Lallemand JY, Tilbeurgh Hv, Jacquet E.** *Structure of the human multidrug resistance protein 1 nucleotide binding domain 1 bound to Mg<sup>2+</sup>/ATP reveals a non-productive catalytic site.* J Mol Biol (2006) 359:940-9.

**Rask-Andersen M, Masuram S, Fredriksson R, Schioth HB.** *Solute carriers as drug targets: Current use, clinical trials and prospective.* Mol Aspects (2013) 34:702-10.

**Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skinotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK.** *Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex.* Nature (2011) 477:549-55.

**Ravaud S, Do Cao MA, Jidenko M, Ebel C, Le Maire M, Jault JM, Di Pietro A, Haser R, Aghajari N.** *The ABC transporter BmrA from Bacillus subtilis is a functional dimer when in a detergent-solubilized state.* Biochem J (2006) 395:345-53.

**Rees DC, Johnson E, Lewinson O.** *ABC transporters: the power to change.* Nat Rev Mol Cell Biol (2009) 10:218-27.

**Reyes CL, Chang G.** *Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP vanadate and lipopolysaccharide.* Science (2005) 308:1028-31.

**Ringpfeil F, Lebwohl MG, Christiano AM, Uitto J.** *Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter.* Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97:6001-6.

**Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL.** *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.* Science (1989) 245:1066-73.

**Riordan JR.** *Assembly of functional CFTR chloride channels.* Annu Rev Physiol (2005) 67:701-18.

**Rochat B, Morsman JM, Murray GI, Figg WD, Mcleod HL.** *Human CYP1B1 and anticancer agent metabolism: mechanism for tumor-specific drug inactivation?* J Pharmacol Exp Ther (2001) 296:537-41.

**Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF.** *Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis.* J Biol Chem (1997) 272:10685-94.

**Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG, Cole SP.** *The structure of the multidrug resistance protein 1(MRP1/ABCC1). Crystallization and single-particle analysis.* J Biol Chem (2001) 276:16076-82.

**Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC, Riordan JR.** *Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).* J Biol Chem (2004) 279:39051-7.

**Rosenberg MF, Callaghan R, Modok S, Higgins CF, Ford RC.** *Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state.* J Biol Chem (2005) 280:2857-62.

**Runger TM, Emmert S, Schadendorf D, Diem C, Epe B, Hellfritsch D.** *Alterations of DNA repair in melanoma cells lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide.* J Invest Dermatol (2000) 114:34-39.

**Russo Krauss I, Sica F, Mattia CA, Merlino A.** *Increasing the X-ray diffraction power of protein crystals by dehydration: the case of bovine serum albumin and a survey of literature data.* Int J Mol Sci (2012) 13:3782-800.

**Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denèfle P, Assmann G.** *Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1.* Nat Genet (1999) 22:352-5.

## S

**Sala E, de Marco A.** *Screening optimized protein purification protocols by coupling small-scale expression and mini-size exclusion chromatography.* Protein Expr Purif (2010) 74:231-5.

**Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M, Howell SB.** *Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells.* Clin Cancer Res (2004) 10:4661-9.

**Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A.** *Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system.* Physiol Rev (2006) 86:1179-236.

**Sauna ZE, Kim IW, Nandigama K, Kopp S, Chiba P, Ambudkar SV.** *Catalytic cycle of ATP hydrolysis by P-glycoprotein: evidence for formation of the E.S. reaction intermediate with ATP- $\gamma$ -S, a nonhydrolyzable analogue of ATP.* Biochemistry (2007) 46:13787-99.

**Saurin W, Hofnung M, Dassa E.** *Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters.* J Mol Evol (1999) 48:22-41.

**Schagger H, von Jagow G.** *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.* Anal Biochem (1987) 166:368-79.

**Scheffel F, Demmer U, Warkentin E, Hülsmann A, Schneider E, Ermler U.** *Structure of the ATPase subunit CysA of the putative sulfate ATP-binding cassette (ABC) transporter from Alicyclobacillus acidocaldarius.* FEBS Lett. (2005) 579:2953-8.

**Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E.** *Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of Saccharomyces cerevisiae.* Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96:10206-11.

**Schmitt L, Benabdelhak H, Blight MA, Holland IB, Stubbs MT.** *Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B : identification of a variable region within ABC helical domains.* J Mol Biol (2003) 330:333-42.

**Schneider E, Hunke S.** *ATP-binding -cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains.* FEMS Microbiol Rev (1998) 22:1-20.

**Schwarz CK, Tschapek B, Jumpertz T, Jenewein S, Lecher J, Willbold D, Panjikar S, Holland IB, Smits SH, Schmitt L.** *Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of an oligomeric species of a refolded C39 peptidase-like domain of the Escherichia coli ABC transporter haemolysin B.* Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun (2011) 67:630-3.

**Seeger MA, Schiefner A, Eicher T, Verrey F, Diederichs K, Pos KM.** *Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism.* Science (2006) 313:1295-8.

**Seeger MA, von Ballmoos C, Eicher T, Brandstatter L, Verrey F, Diederichs K, Pos KM.** *Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB.* Nat Struct Mol Biol (2008) 15:199-205.

**Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT, Hamilton TC.** *Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines.* Cancer Res (2003) 63:1311-1316.

**Senior AE, al-Shawi MK, Urbasch IL.** *The catalytic cycle of P-glycoprotein.* FEBS Lett (1995) 377:285-289.

**Sennhauser G, Amstutz P, Briand C, Storchenegger O, Grutter MG.** *Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPin inhibitors.* PLoS Biol (2007) 5:e7.

**Shahar OD, Kalousi A, Eini L, Fisher B, Weiss A, Darr J, Mazina O, Bramson S, Kupiec M, Eden A, Meshorer E, Mazin AV, Brino L, Goldberg M, Soutoglou E.** *A high-throughput chemical screen with FDA approved drugs reveals that the antihypertensive drug spironolactone impairs cancer cell survival by inhibiting homology directed repair.* Nucleic Acids Res (2014) 42:5689-701.

**Sharom FJ.** *Shedding light on drug transport : structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1).* Biochem Cell Biol (2006) 84:979-92.

**Sharpe ML, Baker EN, Lott JS.** *Crystallization of a protein using dehydration without a precipitant.* Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun (2005) 61 :565-8.

**Sherman DJ, Lazarus MB, Murphy L, Liu C, Walker S, Ruiz N, Kahne D.** *Decoupling catalytic activity from biological function of the ATPase that powers lipopolysaccharide transport.* Proc Natl Acad Sci USA (2014) 111:4982-7.

**Shevchenko V, Gushchin I, Polovinkin V, Round E, Borshchevskiy V, Utrobin P, Popov A, Balandin T, Büldt G, Gordeliy V.** *Crystal structure of Escherichia coli expressed Haloarcula marismortui bacteriorhodopsin I in the trimeric form.* PLoS One (2014) 9:e112873.

**Shi C, Shao W, Xiong Y, Tian C.** *A gas chromatographic method for quantification of detergents frequently used in membrane protein structural studies.* Anal Biochem (2008) 383:326-8.

**Shi C, Han F, Xiong Y, Tian C.** *A gas chromatography-mass spectrometry method to monitor detergents removal from a membrane protein sample.* Protein Expr Purif (2009) 68:221-5.

**Shimizu T, Johnson KA.** *Presteady state kinetic analysis of vanadate-induced inhibition of the dynein ATPase.* J Biol Chem (1983) 258:13833-40.

**Shintre CA, Pike AC, Li Q, Kim JI, Barr AJ, Goubin S, Shrestha L, Yang J, Berridge G, Ross J, Stansfeld PJ, Sansom MS, Edwards AM, Bountra C, Marsden BD, von Delft AN, Gileadi O, Burgess-Brown NA, Carpenter EP.** *Structures of ABCB10, a human ATP-binding cassette transporter in apo- and nucleotide bound states.* Proc Natl Acad Sci USA (2013) 110:9710-5.

**Shirihai OS, Gregory T, Yu C, Orkin SH, Weiss MJ.** *ABC-me : a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during differentiation.* EMBO J (2000) 19:2492-502.

**Siarheyeva A, Liu R, Sharom FJ.** *Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis.* J Biol Chem (2010) 285:7575-86.

**Slotboom DJ, Duurkens RH, Olieman K, Erkens GB.** *Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution.* Methods (2008) 46:73-82.

**Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem (1985) 150:76-85.

**Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, Hunt JF.** *ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer.* Mol Cell (2002) 10:139-49.

**Sonoda Y, Cameron A, Newstead S, Omote H, Moriyama Y, Kasahara M, Iwata S, Drew D.** *Tricks of the trade used to accelerate high-resolution structure determination of membrane proteins.* FEBS Lett (2010) 584:2539-47.

**Sprowl JA, Mikkelsen TS, Giovino H, Sparreboom A.** *Contribution of tumoral and host solute carriers to clinical drug response.* Drug Resist Updat (2012) 15:5-20.

**Srinivasan V, Pierik AJ, Lill R.** *Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1.* Science (2014) 343:1137-40.

**Steinfels E, Orelle C, Dalmas O, Penin F, Miroux B, Di Pietro A, Jault JM.** *Highly efficient over-production in E. coli of YvcC, a multidrug like ATP-binding cassette transporter from Bacillus subtilis.* Biochim Biophys Acta (2002) 1565:1-5.

**Steinfels E, Orelle C, Fantino JR, Dalmas O, Rigaud JL, Denizot F, Di Pietro A, Jault JM.** *Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in Bacillus subtilis.* Biochemistry (2004) 43:7491-502.

**Stenham DR, Campbell JD, Sansom MS, Higgins CF, Kerr ID, Linton KJ.** *An atomic detail model for the human ATP binding cassette transporter P-glycoprotein derived from disulfide cross-linking and homology modeling.* FASEB J (2003) 17:2287-9.

**Stiborova M, Bieler CA, Wiessler M, Frei E.** *The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts.* Biochem Pharmacol (2001) 62:1675-84.

**Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ.** *A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis.* Nat Genet (1998) 20:233-8.

**Strop P, Bronger AT.** *Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins.* Protein Sci (2005) 14:2207-11.

**Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Gentle C, Gottesman MM.** *Targeting multidrug resistance in cancer.* Nat Rev Drug Discov (2006) 5:219-34.

**T**

**Tamaki H, Harashima N, Hiraki M, Arichi N, Nishimura N, Shiina H, Naora K, Harada M.** *Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition.* *Oncotarget* (2014) 5:11399-412.

**Teicher BA, Herman TS, Holden Sa, Wang YY, Pfeffer MR, Crawford JW, Frei E.** *Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo.* *Science* (1990) 247:1457-61.

**Tennent JM, Lyon BR, Midgley M, Jones IG, Purewal AS, Skurray RA.** *Physical and biochemical characterization of the qacA gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in Staphylococcus aureus.* *J Gen Microbiol* (1989) 135:1-10.

**Thibodeau PH, Brautigam CA, Machius M, Thomas PJ.** *Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding.* *Nat Struct Mol Biol* (2005) 12:10-6.

**Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aquilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J.** *Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy.* *Science* (1995) 268: 426-9.

**Tian Q, Zhang J, Tan TM, Chan E, Duan W, Chan SY, Boelsterli UA, Ho PC, Yang H, Bian JS, Huang M, Zhu YZ, Xiong W, Li X, Zhou S.** *Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins.* *Pharm Res* (2005) 22:1837-53.

**Tirado-Lee L, Lee A, Rees DC, Pinkett HW.** *Classification of a Haemophilus influenzae ABC transporter HI1470/71 through its cognate molybdate periplasmic binding protein, MoIA.* *Structure* (2011) 19:1701-10.

**Tornroth-Horsefield S, Gourdon P, Horsefield R, Brive L, Yamamoto N, Mori H, Snijder A, Neutze R.** *Crystal structure of AcrB in complex with a single transmembrane subunit reveals another twist.* *Structure* (2007) 15:1663-73.

**Tsai MF, Li M, Hwang TC.** *Stable ATP binding mediated by a partial NBD dimer of the CFTR chloride channel.* *J Gen Physiol* (2010) 135:399-414.

## U

**Ujwal R, Bowie JU.** *Crystallizing membrane proteins using lipidic bicelles.* *Methods* (2011) 55:337-41.

**Urbani A, Warne T.** *A colorimetric determination for glycosidic and bile salt-based detergents: applications in membrane protein research.* *Anal Biochem* (2005) 336:117-24.

## V

**Van der Does C, Tampé R.** *How do ABC transporters drive transport ?* *Biol Chem* (2004) 385:927-33.

**Van der Heide T, Poolman B.** *ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites?* *EMBO Rep* (2002) 3:938-43.

**Van Veen HW, Venema K, Bolhuis H, Oussenko I, Kok J, Poolman B, Driessen AJ, Konings WN.** *Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1.* *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93:10668-72.



**van Wonderen JH, McMahon RM, O'Mara ML, McDevitt CA, Thomson AJ, Kerr ID, MacMillan F, Callaghan R.** *The central cavity of ABCB1 undergoes alternating access during ATP hydrolysis.* FEBS J (2014) 281:2190-201.

**Varade D, Patel V, Bahadur A, Bahadur P, Vethamuthu MS.** *Mixed micelles of cationic surfactants and sodium cholate in water.* Indian J Biochem Biophys (2004) 41:107-12.

**Veesler D, Blangy S, Cambillau C, Sciara G.** *There is a baby in the bath water: AcrB contamination is a major problem in membrane-protein crystallization.* Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun (2008) 64:880-5.

**Velarde G, Ford RC, Rosenberg MF, Powis SJ.** *Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single particle image analysis.* J Biol Chem (2001) 276:46054-63.

**Verdon G, Albers SV, Dijkstra BW, Driessen AJ, Thunnissen AM.** *Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus* : nucleotide-free and nucleotide-bound conformations.* J Mol Biol (2003) 330:343-58.

**Verhalen B, Wilkens S.** *P-glycoprotein retains drug-stimulated ATPase activity upon covalent linkage of the two nucleotide binding domains at their C-terminal ends.* J Biol Chem (2011) 286:10476-82.

**Vigano C, Grimard V, Margolles A, Goormaghtigh E, van Veen HW, Konings WN, Ruyschaert JM.** *A new experimental approach to detect long-range conformational changes transmitted between the membrane and cytosolic domains of LmrA, a bacterial multidrug transporter.* FEBS Lett (2002) 530:197-203.

**Vousden KH, Lane DP.** *P53 in health and disease.* Nat Rev Mol Cell Biol (2007) 8:275-83.

## W

**Wagner S, Klepsch MM, Schlegel S, Appel A, Draheim R, Tarry M, Högbom M, van Wijk KJ, Slotboom DJ, Persson JO, de Gier JW.** *Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression.* Proc Natl Acad Sci USA (2008) 105:14371-6.

**Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ.** *Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.* EMBO J (1982) 1:945-51.

**Wang Z, Xiang Q, Zhu X, Dong H, He C, Wang H, Zhang Y, Wang W, Dong C.** *Structural and functional studies of conserved nucleotide-binding protein LptB in lipopolysaccharide transport.* Biochem Biophys Res Commun (2014) 452:443-9.

**Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, Chang G.** *Flexibility in the ABC transporter MsbA : Alternating access with a twist.* Proc Natl Acad Sci USA (2007) 104:19005-10.

**Ward AB, Szewczyk P, Grimard V, Lee CW, Martinez L, Doshi R, Caya A, Villaluz M, Pardon E, Cregger C, Swartz DJ, Falson P, Urbatsch IL, Govaerts C, Steyaert J, Chang G.** *Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope of the nucleotide-binding domain.* Proc Natl Acad Sci USA (2013) 110:13386:91.

**Watkins PA, Gould SJ, Smith MA, Braiterman LT, Wei HM, Kok F, Moser AB, Moser HW, Smith KD.** *Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy.* Am J Hum Genet (1995) 57:292-301.



**Weisblum B.** *Erythromycin resistance by ribosome modification.* Antimicrob Agents Chemother (1995) 39:577-85.

**Wen PC, Verhalen B, Wilkens S, Mchaourab HS, Tajkhorshid E.** *On the origin of large flexibility of P-glycoprotein in the inward-facing state.* J Biol Chem (2013) 288:19211-20.

**Wernimont A, Edwards A.** *In situ proteolysis to generate crystals for structure determination: an update.* PLoS ONE (2009) 4:e5094.

**Whatcott CJ, Han H, Posner RG, Von Hoff DD.** *Tumor-stromal interactions in pancreatic cancer.* Crit Rev Oncog (2013) 18:135-51.

**White MA, Clark KM, Grayhack EJ, Dumont ME.** *Characteristics affecting expression and solubilization of yeast membrane proteins.* J Mol Biol (2007) 365:621-36.

**White JF, Noinaj N, Shibata Y, Love J, Kloss B, Xu F, Gvozdenovic-Jeremic J, Shah P, Shiloach J, Tate CG, Grisshammer R.** *Structure of the agonist-bound neurotensin receptor.* Nature (2012) 490:508-13.

**Wiener MC.** *A pedestrian guide to membrane protein crystallization.* Methods (2004) 34:364-72.

**Wlodawer A, Hodgson KO.** *Crystallization and crystal data of monellin.* Proc Natl Acad Sci USA (1975) 72:398-9.

**Woo JS, Zeltina A, Goetz BA, Locher KP.** *X-ray structure of the Yersinia Pestis heme transporter HmuUV.* Nat Struct Mol Biol. (2012) 19:1310-5.

**Wu CC, Li TK, Farh L, Lin LY, Lin TS, Yu YJ, Yen TJ, Chiang CW, Chan NL.** *Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide.* Science (2011) 333:459-62.

## Y

**Yamagishi T, Sahni S, Sharp DM, Arvind A, Jansson PJ, Richardson DR.** *P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration.* J Biol Chem (2013) 288:31761-71.

**Yin Y, He X, Szewczyk P, Nguyen T, Chang G.** *Structure of the multidrug transporter EmrD from Escherichia coli.* Science (2006) 312:741-4.

**Yu EW, Aires JR, Nikaido H.** *AcrB multidrug efflux pump of Escherichia coli: Composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity.* J Bacteriol (2003) 185:5657-64.

**Yu EW, Aires JR, McDermott G, Nikaido H.** *A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study.* J Bacteriol (2005) 187:6804-15.

**Yu J, Ge J, Heuveling J, Schneider E, Yang M.** *Structural basis for substrate specificity of an amino acid ABC transporter.* Proc Natl Acad Sci USA (2015) 112:5243-8.

**Yuan YR, Martsinkevich O, Hunt JF.** *Structural characterization of an MJ1267 ATP-binding cassette crystal with a complex pattern of twinning caused by promiscuous fiber packing.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr (2003) 59:225-38.

## Z

**Zaitseva J, Holland IB, Schmitt L.** *The role of CAPS buffer in expanding the crystallization space of the nucleotide binding domain of the ABC transporter haemolysin B from Escherichia coli.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr (2004) 60:1076-84.

**Zaitseva J, Jenewein S, Jumpertz T, Holland IB, Schmitt L.** *H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB.* EMBO J (2005) 24:1901-10.

**Zaitseva J, Oswald C, Jumpertz T, Jenewein S, Wiedenmann A, Holland IB, Schmitt L.** *A structural analysis of asymmetry required for catalytic activity of an ABC-ATPase domain dimer.* EMBO J (2006) 25:3432-43.

**Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B.** *Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents.* Science (2000) 290:989-92.

**Zhang DW, Graf CA, Gerard RD, Cohen JC, Hobbs HH.** *Functional asymmetry of nucleotide-binding domains in ABCG5 and ABCG8.* J Biol Chem (2006) 281:4507-16.

**Zhang Q, Ma X, Ward A, Hong WX, Jaakola VP, Stevens RC, Finn MG, Chang G.** *Designing facial amphiphiles for the stabilization of integral membrane proteins.* Angew Chem Int Ed Engl. (2007) 46:7023-5.

**Zoghbi ME, Fuson KL, Sutton RB, Altenberg GA.** *Kinetics of the association/dissociation cycle of an ATP-binding cassette nucleotide-binding domain.* J Biol Chem (2012) 287:4157-64.

**Zolnerciks JK, Wooding C, Linton KJ.** *Evidence for a Sav1866-like architecture for the human multidrug transporter P-glycoprotein.* FASEB J (2007) 21:3937-48.

**Zou P, Bortolus M, McHaourab HS.** *Conformational cycle of the ABC transporter MsbA in liposomes: detailed analysis using double electron-electron resonance spectroscopy.* J Mol Biol (2009) 393:586-97.

**Zou P, McHaourab HS.** *Increased sensitivity and extended range of distance measurements in spin-labeled membrane proteins: Q-band double electron-electron resonance and nanoscale bilayers.* Biophys J (2010) 98:L18-20.

---

TITRE en français : Cristallisation du transporteur ABC BmrA de *Bacillus subtilis*. Développement d'une nouvelle méthode de dosage des détergents par *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI).

---

RESUME en français : Notre projet vise à déterminer la structure 3D du transporteur BmrA de *Bacillus subtilis*. La protéine a été purifiée dans six détergents différents. L'utilisation de foscholine 12, a conduit à cristalliser OmpF, une porine de la membrane externe d'*E. coli*. Nous montrons que les conditions de cristallisation influencent directement l'empilement cristallin d'OmpF. Le protocole de purification de BmrA, optimisé en utilisant du triton X100 à l'extraction puis un mélange  $\beta$ -D-dodecyl maltoside-cholate pour les étapes chromatographiques nous a permis d'obtenir à 4°C des cristaux, pour lesquels nous avons vérifié qu'ils sont constitués de BmrA. Ces cristaux ont permis d'obtenir un jeu complet jusqu'à 7 Å. Ces données de diffraction constituent une avancée significative pour résoudre à court terme la structure 3D de BmrA.

Nous avons développé une nouvelle méthode de dosage des détergents qui est basée sur la détermination par spectrométrie de masse de type MALDI du ratio d'isotopes deutérés/protonés. La méthode a été validée avec la FC12, le DDM, le  $\beta$ -OG, le LMNG, le CHAPS, le cholate et des détergents calix[4]aréniques, en mesurant la concentration de ces détergents dans différentes conditions d'extraction/purification, de concentration, dialyse et gel filtration, de différentes protéines membranaires. Cette méthode nous a permis (i) d'estimer la taille de la ceinture de détergent associée à BmrA et d'autres protéines membranaires (ii) de moduler cette taille en fonction de mélange de détergents et (iii) d'apporter des informations sur le comportement des complexes protéine-détergent.

---

TITRE en anglais : Crystallization of BmrA, bacterial ABC transporter. Development of a new detergents dosage assay by *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI).

---

RESUME en anglais : Our project aims to determine the 3D structure of BmrA from *Bacillus subtilis*. The protein was purified in six different detergents. Using foscholine 12, led to crystallize OmpF, an outer membrane porin of *E. coli*. We show that the crystallization conditions directly influence the crystal packing of OmpF. The BmrA purification protocol optimized by using Triton X100 at the extraction and a mixture  $\beta$ -D-dodecyl-maltoside cholate for chromatographic steps allowed us to get to 4°C crystals, for which we verified they consist of BmrA. These crystals have yielded full data to 7 Å. These diffraction data are a significant advance in the short term to resolve the 3D structure of BmrA.

We have developed a new detergents dosage assay which is based on the determination by MALDI-type mass ratio of deuterated isotopes / protonated. The method was validated with the FC12, the DDM, the  $\beta$ -OG, the LMNG, CHAPS, cholate detergents and calix [4] aréniques by measuring the concentration of these detergents in different conditions of extraction/purification, concentration, dialysis and gel filtration, of different membrane proteins. This method allowed us (i) to estimate the size of the detergent belt associated to BmrA and other membrane proteins (ii) to modulate this size in terms of the detergent mixture and (iii) to provide information on the behavior of complex protein-detergent.

---

DISCIPLINE : Biochimie structurale et fonctionnelle

---

MOTS-CLES : Transporteurs ABC, phénotype de résistance à de multiples drogues, protéines membranaires, cristallisation, structure 3D, dosage des détergents

---

Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) – FR 3302  
 Unité BMSSI –UMR 5086 CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1  
 Equipe Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Médicaments  
 7, passage du Vercors – 69 367 LYON cedex 07